

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Dpto. Biología Molecular



**PAPEL ANTI-APOPTÓTICO DE LA LIPOXINA A₄
EN MACRÓFAGOS: IMPLICACIONES EN
LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN**

PATRICIA PRIETO CHINCHILLA

TESIS DOCTORAL

MADRID, 2010

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL



PAPEL ANTI-APOPTÓTICO DE LA LIPOXINA A₄ EN MACRÓFAGOS: IMPLICACIONES EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Presentada por
PATRICIA PRIETO CHINCHILLA
para aspirar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por:
DR. LISARDO BOSCA GOMAR

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIBM), centro mixto CSIC-UAM, bajo la dirección del Dr. Lisardo Boscá Gomar con la ayuda de una beca de formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

“Todo esfuerzo tiene su recompensa”

Para mi familia

Para Edu

Agradecimientos

Y por fin ha llegado este momento... No me lo creo!!! Miro atrás y me veo cuando llegué al labo, bastante más joven, con menos kilos y más pelo... jajajajja... Me alegra darme cuenta de que a pesar de todo sigo manteniendo la misma ilusión y curiosidad por la ciencia que cuando decidí que quería ser “investigadora”.

Y, como mi madre me enseñó que “De bien nacidos es ser agradecidos”, quiero dar las gracias a todos los que me han acompañado en este camino, a veces bastante duro, que es una Tesis Doctoral. En primer lugar, como no puede ser de otra manera al Dr. Lisardo Boscá que me dio la oportunidad, sin conocerme, de trabajar en su laboratorio. Gracias jefe por darme libertad para tomar mis propias decisiones, por enseñarme que hay que mirar la ciencia con los ojos más abiertos y no creer siempre lo que “parece que debería ser”. También quiero agradecer a la Dra. Martín-Sanz, la que considero mi otra jefa. Gracias Paloma, por toda tu ayuda a lo largo de estos años, por revisar la tesis, por todo, gracias.

Quiero agradecer también a mi tutor, el Dr. Manuel Fresno, por su amabilidad y a Magdalena Sanz por su eficacia y su ayuda con todos los trámites burocráticos.

Ahora que miras atrás te vienen a la cabeza los comienzos. Gracias al Dr. Jorge Martín y a todo el antiguo labo 0.2 del IIB, a Lorena, Jose, Teresa, Mer y Anna con los que empecé a “cacharrear” en un laboratorio. Gracias por vuestro ánimo, ayuda y por todos los momentos compartidos. ¡Aprendí mucho de cada uno de vosotros!

Quería agradecer a los servicios del IIB por su trabajo, en especial a Laura de citometría, por las horas de charla mientras pasaban las muestras, por quedarse más tarde para que pasasen mis cien mil tubos, por toda tu paciencia, un beso!

También dar las gracias al Dr. Antonio Cuadrado por prestarnos los ratones Nrf-2^{-/-}, que me permitieron hacer toda una serie de experimentos así como por

los plásmidos usados en las transfecciones celulares. Gracias en especial a Ana, por su ayuda siempre que la he necesitado.

Gracias también a las niñas del B-15, en especial a Marta e Irene. Gracias Irenilla, toda una señora doctora, por consolarme en momentos de agobio, por las charlas en los pasillos, por no dejarme pensar en negativo, por animarme a lo largo de la escritura de la tesis. Eres un sol! Gracias!

También a la gente de los otros laboratorios que me han prestado su ayuda desinteresada en distintos momentos a lo largo de estos cuatro años, en especial a Raquel del B-18, ¡qué chica tan maja! y a Luci, del B-19 por su simpatía.

A mi grupo americano, gente a la que nunca podré olvidar. Al Dr. Engman, por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio, por su amabilidad y por animarme siempre con mi inglés macarrónico! A Cheryl, una joya de persona, por recogerme en el aeropuerto el primer día que llegué a Chicago muerta de miedo, por cuidarme como una madre durante los tres meses que pasé en USA, Thanks so much!!! Nunca estaré suficientemente agradecida. A mi compañera Kim, por su paciencia conmigo, por los buenos momentos que compartimos, por su sonrisa, por aquel regalo que me hizo llorar el último día, por su cariño, gracias. Al Dr. Conrad Epting, por estar pendiente de mí, por sus charlas científicas y por su ayuda en todo momento. Y como no, al resto del grupo, Danieja, gracias por llevarme de tiendas y por tu música en español que tanto me alegraba los días lejos de casa, a Debby, por llevarme a ver a los Cubs y por repetirme incansablemente las frases una y otra vez... a Joann, trabajadora ejemplar con los animales, a Teresa y Kevin por acogerme en el labo. Gracias a todos por hacerme sentir parte del laboratorio, por vuestro cariño, gracias!

Y como no, a la gente más importante, mi grupo, el B-11!!! Arriba los invisibles!!! Jajaja!!! Para comenzar, mil gracias Jime (Miss Chile), por todo lo que me has enseñado, por tu ayuda a nivel científico y personal, por el cariño que me has demostrado... Gracias!!! Aunque por problemas de agenda (¡tengo que leer una tesis!) no estaré en tu boda, sabes que te deseo toda la felicidad del mundo. A Rafita (Mister Gruñón), por ayudarme mil veces, por enseñarme

con toda la paciencia del mundo, por todas las risas y las peleas! Jajaja, por ser un “cerebrito” que siempre me sorprende con cosas nuevas, gracias Rafa. A Paqui (Miss simpatía), gracias por tu ayuda, por animarme en los malos momentos y por todo lo que me has enseñado. El labo no será lo mismo sin vosotros. A María (para mí Meri, Miss tikismikis!) por escucharme y apoyarme, por esas charlas donde los problemas compartidos se hacen más pequeños, por tu sinceridad y tu gusto por las cosas bien hechas, gracias. A Tania (Miss Fashion) por todas las risas que hemos compartido, sin ti en el labo hemos perdido en glamour... Un beso enorme! A Vero (Miss Terroncito), el auténtico terremoto del B-11, por tu frescura, porque matas arañas radiactivas como nadie, por hacerme reír cada día y por entenderme con solo mirarnos... jajajaja! A Cris (Miss Despiste), María Pimentel (Miss Lagartera) y María (Miss última adquisición) por dar el punto ilusión al labo, por compartir cada día vuestro entusiasmo y amistad, gracias chicas!!! Tampoco puedo olvidarme de mis niñas brasileiras, Simone, Alziana y Luciane, todas ellas unos soles, por los buenos momentos que compartimos durante vuestras estancias en el labo, Muito Obrigado niñas! Ha sido un honor trabajar con todos vosotros, gracias a todos amores y amoras!!!!

Quiero dar las gracias también a todos aquellos que, sin saber en realidad en qué trabajo (con tubitos, ratones, plantas???...) siempre me animan a seguir, a mirar hacia delante, a veces sin darse cuenta.

A mis amigos, por ayudarme a superar los momentos de bajón y por alegrarse de mis pequeños triunfos. En especial a mi neni, Laura, por animarme siempre, por darme inyecciones de la energía que muchas veces me falta, por entrenarme (a pesar de todo... jajaja), por venir a verme a Chicago, por ser como eres... Muchas gracias guapa!!!!

Como no dar las gracias al pilar de mi vida, mi familia. A mis padres por darme su cariño y apoyo constante a pesar de lo inestable que puede llegar a ser el mundo de la ciencia, por ser los mejores padres que nadie pueda tener, porque os quiero con locura. A mi hermana, mi Mari, por confiar siempre en mí, por enseñarme que siempre hay otra forma de ver las cosas, por tu locura y

amor incondicional, te quiero tati. Y como no, a mi rancio favorito, mi hermano, a pesar de que siga creyendo que trabajo en cáncer de mama... te quiero brou. No me olvido del resto de mi familia, mis alicantinos y en especial de mi niña, Andrea, por llamarme para preguntar qué tal mi primer día, por estar siempre pendiente de mí a pesar de las distancias, por quererme tanto, porque a pesar de que crezcas siempre serás mi niña. Y como no mi abuela, a la que adoro, por preocuparse tanto por mí, por rezar cada día para que todo me vaya bien, te quiero mucho abuela! Y a ti abuelo, que a pesar de que ya no estás con nosotros, estoy segura de que me cuidas desde donde quiera que estés.

Y para finalizar quiero darte las gracias a ti amore, por ser mi otra mitad, por escuchar con paciencia mis interminables charlas sobre el labo, por compartir tu vida conmigo, por cuidarme siempre y por animarme a cada paso... te quiero mucho cariño!!!

Índice

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	15
SUMMARY.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS.....	23
1.1. Vía apoptótica extrínseca: “Receptores de muerte”.	25
1.1.1. Vía mediada por el receptor FAS (CD95).....	25
1.1.2. Vía mediada por el receptor de TNF (TNF-R).	26
1.2. Vía apoptótica intrínseca: “Ruta mitocondrial”.....	27
1.2.1. La familia de proteínas Bcl-2.....	28
1.2.2. Citocromo c.....	30
1.2.3. AIF.....	30
1.3. Caspasas.....	31
1.4. Proteínas IAPs.....	32
2. VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR.....	32
2.1. Vía de las MAPKs: activación de ERK.....	32
2.2. Vía de PI3K y Akt.....	34
2.3. Vía antioxidante mediada por Nrf-2 y HO-1.....	35
3. LIPOXINAS: COMPUESTOS LIPÍDICOS RESOLUTIVOS.....	37
3.1. Lipoxigenasas (LOX).....	39
3.2. Biosíntesis de lipoxinas.....	40
3.3. Receptor de las lipoxinas: ALX.....	42
3.4. Efectos biológicos de las lipoxinas.....	44
OBJETIVOS.....	49

MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1. MATERIALES.....	53
1.1. Reactivos.....	53
1.2. Animales.....	54
2. MÉTODOS.....	56
2.1. CULTIVO CELULAR.....	56
2.1.1. Cultivo de líneas celulares.....	56
2.1.2. Cultivo de células primarias murinas.....	56
2.1.3. Cultivo de células primarias humanas.....	57
2.2. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	58
2.2.1. Análisis de la fragmentación del ADN con IP.....	58
2.2.2. Análisis de la apoptosis temprana con anexina V....	58
2.3. ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	59
2.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES.....	59
2.5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS.....	60
2.6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS ENRIQUECIDOS EN MITOCONDRIA.....	60
2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	61
2.8. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOT”.....	61
2.8.1. Electroforesis y transferencia.....	61
2.8.2. Inmunodetección.....	62
2.9. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES CELULARES.....	62
2.9.1. Transformación de bacterias competentes.....	62
2.9.2. Crecimiento de bacterias transformadas y purificación de plásmidos.....	63
2.9.3. Transfección de células y ensayos de actividad luciferasa.....	63

2.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CASPASA.....	64
2.10.1. Determinación “ <i>in vitro</i> ” mediante fluorimetría...	64
2.10.2. Determinación “ <i>in vivo</i> ” mediante CaspGLOW® ...	64
2.11. INMUNOFLUORESCENCIA.....	65
2.12. PCR CUANTITATIVA (<i>qPCR</i>).....	65
2.12.1. Aislamiento del ARN.....	65
2.12.2. Retrotranscripción (RT).....	66
2.12.3. PCR cuantitativa (<i>qPCR</i>).....	67
2.13. ESTADÍSTICA.....	68
RESULTADOS.....	71
1. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ EJERCE UN PAPEL PROTECTOR FRENTE A LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RAW 264.7.....	71
1.1. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la apoptosis inducida por estaurosporina en RAW 264.7.....	71
1.2. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la apoptosis inducida por otros estímulos.....	76
2. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS EN CÉLULAS RAW 264.7.....	77
2.1. Determinación “ <i>in vitro</i> ” de los efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la activación de caspasas.....	77
2.2. Determinación “ <i>in vivo</i> ” de los efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la activación de caspasas.....	78
3. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ NO EJERCE EFECTOS NOTABLES SOBRE LA VÍA DE APOPTOSIS EXTRÍNSECA EN RAW 264.7.....	79
3.1. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la vía de FAS....	79
3.2. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la vía de TNF- α .	81
4. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ INHIBE LA APOPTOSIS A TRAVÉS DE LA VÍA MITOCONDRIAL.....	82
4.1. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2.....	82

4.2. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre el citocromo c mitocondrial.....	85
4.3. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la liberación de AIF.....	85
5. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ REDUCE EL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR.....	88
6. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ INDUCE LA ACTIVACIÓN DE ERK.....	89
7. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ PRODUCE UNA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE PI3K/Akt.....	91
8. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ INDUCE LA ACTIVACIÓN DE Nrf-2.....	93
8.1. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre los niveles proteicos de Nrf-2 en el núcleo celular.....	93
8.2. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la actividad de Nrf-2.....	93
8.3. Efectos del tratamiento con LXA ₄ en macrófagos peritoneales de ratones Nrf-2 ^{-/-}	96
9. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ POSEE UN EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.....	98
9.1. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la apoptosis inducida por Stau en macrófagos peritoneales.....	98
9.2. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la apoptosis inducida por diferentes estímulos pro-apoptóticos.....	99
9.3. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la activación de ERK.....	100
9.4. Efectos del tratamiento con LXA ₄ sobre la activación de la vía de PI3K/Akt.....	102

10. EL TRATAMIENTO CON LXA ₄ EJERCE UN EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS HUMANOS.....	104
10.1. Efectos del tratamiento con LXA ₄ en la línea celular THP-1.....	104
10.1.1. Efectos de la LXA ₄ sobre la apoptosis.....	104
10.1.2. Efecto de la LXA ₄ sobre la activación del eje ERK/Nrf-2.....	106
10.2. Efectos del tratamiento con LXA ₄ en macrófagos humanos primarios.....	106
10.2.1. Efectos de la LXA ₄ sobre la apoptosis.....	106
10.2.2. Efectos de la LXA ₄ sobre la activación del eje ERK/Nrf-2.....	108
10.2.3. Efecto de la LXA ₄ sobre la vía de Akt.....	110
 DISCUSIÓN.....	115
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135
 ANEXO I: Artículos publicados	
ANEXO II: CD Tesis Doctoral	

Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AhR	Receptor arilohidrocarbano
AIF	Factor inductor de apoptosis
Akt/PKB	Proteína quinasa B
ALX	Receptor de lipoxina
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas-1
Arbp	Fosfoproteína ribosomal ácida P ₀
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	Ácido acetil-salicílico
ATL	Lipoxinas derivadas de la aspirina
ATP	Adenosín Trifosfato
Bad	Promotor de muerte asociado a Bcl-2
Bak	Antagonista/"killer" de Bcl-2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Célula B del linfoma 2, del inglés " <i>B-Cell Lymphoma-2</i> "
Bcl-XL	Proteína tipo Bcl-2, isoforma larga
BH	Dominios de homología con Bcl-2
Bid	Proteína con dominio de muerte de interacción con Bcl-2
Bim	Mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2
BIR	Repetición IAP de Baculovirus
Boc-2	<i>Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe</i> , péptido antagonista de ALX
COX	Ciclooxigenasa
CysLTs	Receptor de cisteinil-leucotrienos
DAF-2	4,5-Diaminofluoresceína
DCFH	2,7-Diclorofluoresceína
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DEPC	Dietilpirocarbonato

DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilen-bis tetra-acético
Endo-G	Endonucleasa G
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Dominio de muerte asociado a FAS
FPR	Receptor Formilo peptídico
FPRL-1	Receptor Formilo peptídico tipo-1
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GSK3β	Quinasa de la Glucógeno-sintasa 3 β
GSNO	S-nitrosoglutation
HO-1	Hemoxigenasa-1
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IFN-γ	Interferón gamma
IL-8	Interleuquina 8
JNK	Quinasa N-terminal de c-Jun
Keap-1	Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch
LB	Medio de crecimiento bacteriano <i>Luria-Bertani</i>
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
LTA₄	Leucotrieno A ₄
LX	Lipoxina
LXA₄	Lipoxina A ₄
LXB₄	Lipoxina B ₄
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
Mcl-1	Proteína 1 de diferenciación en células de leucemia mieloide
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
M-CSF	Factor estimulador de macrófagos

MEK	Proteína quinasa regulada por mitógenos extracelulares
NF-κB	Factor nuclear κB
NO	Óxido nítrico
Nrf-2	Factor 2 relacionado con NF-E2
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PI-4,5-P₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PI-3,4,5-P₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-bifosfato
PMA	<i>13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol</i>
PMBC	Células mononucleares de sangre periférica
PMN	Neutrófilos Polimorfonucleares
PTEN	Fosfatasa homóloga a la tensina
PUMA	Modulador de apoptosis “up-regulado” por p53
RING	Dominio proteico de tipo “dedos de zinc” con una secuencia de aminoácidos concreta
RNasa H	Ribonucleasa H
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
Smac-DIABLO	Activador mitocondrial secundario de caspasas
Stau	Estaurosporina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-R	Receptor de TNF
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociado a TNF-R
TX	Tromboxano
X-IAP	Inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X

Resumen

La lipoxina A₄ (LXA₄) es un mediador lipídico endógeno que requiere un tráfico metabólico transcelular para su síntesis. Las dianas de la LXA₄ en los neutrófilos han sido ampliamente descritas, contribuyendo a atenuar la inflamación. Sin embargo, los efectos de las lipoxinas sobre los macrófagos son menos conocidos, en particular la acción de la LXA₄ en la regulación apoptótica de dichas células. Nuestros datos muestran que el pre-tratamiento de macrófagos tanto humanos como murinos con LXA₄ a las concentraciones observadas en la fase de la resolución de la inflamación (rango nanomolar) inhibe significativamente la apoptosis inducida con estaurosporina (Stau), etopósido y GSNO o por estímulos más patofisiológicos, como LPS/IFN γ . La liberación de mediadores apoptóticos mitocondriales así como la activación de las caspasas, son inhibidas en presencia de LXA₄. Además, el estrés oxidativo inducido por el tratamiento con Stau es atenuado y las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 se acumulan en presencia de LXA₄. El análisis de las dianas celulares de la LXA₄ desveló una activación temprana de las vías PI3K/Akt y ERK/Nrf-2, mediadores responsables de los efectos anti-apoptóticos observados. Estos datos sugieren que la LXA₄, liberada tras el reclutamiento de los neutrófilos a los focos inflamatorios, ejerce un papel protector sobre la viabilidad de los macrófagos que podría contribuir a una mejor resolución de la inflamación.

Summary

Lipoxin A₄ (LXA₄) is an endogenous lipid mediator that requires transcellular metabolic traffic for its synthesis. The targets of LXA₄ on neutrophils are well described, contributing to attenuate inflammation. However, the effects of lipoxins on macrophage are less known, in particular the action of LXA₄ on the regulation of apoptosis of these cells. Our data show that pre-treatment of human or murine macrophages with LXA₄ at the concentrations prevailing in the course of resolution of inflammation (nanomolar range) inhibits significantly the apoptosis induced by staurosporine (Stau), etoposide and GSNO or by more pathophysiological stimuli, such as LPS/IFN γ challenge. The release of mitochondrial mediators of apoptosis as well as the activation of caspases was abrogated in the presence of LXA₄. In addition to this, the oxidative stress induced by staurosporine was attenuated and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family accumulated in the presence of lipoxin. Analysis of the targets of LXA₄ identified an early activation of the PI3K/Akt and ERK/Nrf-2 pathways that was required for the observation of the antiapoptotic effects of LXA₄. These pathways, activated in response to LXA₄, contribute to the upregulation of the antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family and to the transcription of cytoprotective genes under the control of the ERK/Nrf-2 signaling. These data suggest that the LXA₄ released after recruitment of neutrophils to sites of inflammation exerts a protective effect on macrophage viability that might contribute to a better resolution of inflammation.

Introducción

1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS.

El concepto de “muerte celular programada” fue introducido en 1964 cuando se postuló que la muerte celular durante el desarrollo no era accidental sino que seguía una serie de pasos que conducían a la autodestrucción celular de forma controlada tanto local como temporalmente (Lockshin RA, 1964). El término “*apoptosis*” fue acuñado posteriormente, en la década de los 70 y proviene de una palabra griega cuyo significado hace referencia a las “hojas que caen de los árboles” (Kerr et al., 1972).

Actualmente la apoptosis se define como un proceso de muerte celular activo y genéticamente controlado que juega un papel fundamental en el desarrollo de los organismos multicelulares y en la regulación y mantenimiento de las poblaciones celulares en los tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Meier et al., 2000; Raff et al., 1993, 1994). Globalmente posee un importante significado biológico, ya que participa en procesos básicos como desarrollo, diferenciación, proliferación, homeostasis, regulación y función del sistema inmune así como en la eliminación de células defectuosas o dañinas. Por tanto, alteraciones en los procesos apoptóticos pueden promover la aparición de distintas patologías como cáncer (Zivny et al., 2010), procesos autoinmunes (Artemiadis and Anagnostouli, 2010; Mackay, 2009; Nagata et al., 2010), propagación de infecciones virales (Assrir et al., 2010; Herbein et al., 2010; Kaminsky and Zhivotovsky, 2010), enfermedades neurodegenerativas (Tang et al., 2010; Wan et al., 2010) o problemas cardíacos (Chen et al., 2010; Keyes et al., 2010).

La apoptosis celular es un proceso altamente eficiente. Su activación puede ser desencadenada por distintos estímulos, tanto procedentes del exterior como del interior de la propia célula y todos ellos confluyen en una maquinaria común (Green, 1998, 2005; Hengartner, 2000). Las células apoptóticas pueden ser reconocidas por una serie de cambios morfológicos, que

nos permiten diferenciarlas de las células necróticas (Saraste and Pulkki, 2000; Wyllie et al., 1980):

- La membrana plasmática se deforma. La célula pierde su volumen habitual y adquiere una apariencia vesicular característica. Externamente las células parecen estar “hirviendo” (Fig.I).
- La fosfatidilserina es un fosfolípido presente en condiciones normales en la cara interna de la membrana plasmática. Durante las etapas tempranas de la apoptosis este residuo se expone hacia exterior de la misma (Fadok et al., 1998).
- Se produce la condensación de la cromatina y la desintegración de los nucléolos. El ADN nuclear es fragmentado por endonucleasas endógenas (Nagata, 2000; Rich et al., 2000).
- Finalmente la célula se fragmenta en pequeñas estructuras compactas rodeadas de membrana conocidas como “cuerpos apoptóticos”, que contienen el citoplasma, la cromatina condensada y los diversos orgánulos celulares. La integridad de la membrana plasmática se mantiene hasta las etapas finales. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos, siendo eliminados de forma efectiva del tejido afectado sin generar ningún tipo de respuesta inflamatoria, a diferencia de la necrosis, donde el contenido celular es liberado al medio de forma descontrolada (Hotchkiss et al., 2009) (Kroemer et al., 2009).

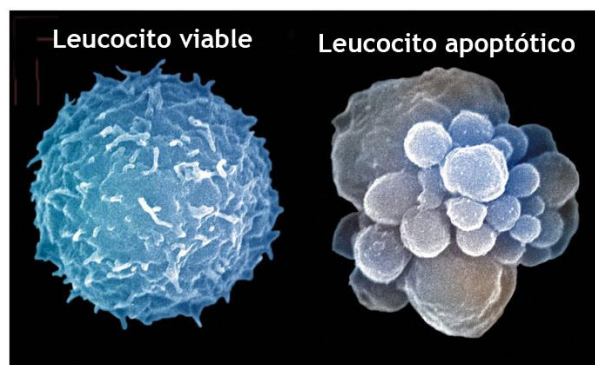


Fig.I: Aspecto exterior de un leucocito apoptótico comparado con uno viable. Se pueden apreciar las protuberancias de la membrana plasmática asociadas al proceso apoptótico.

La mayoría de los procesos apoptóticos convergen en la activación de unas proteasas efectoras, las caspasas, que se encargan de degradar proteínas reguladoras y estructurales lo que produce de forma irreversible el colapso celular (Thornberry and Lazebnik, 1998).

1.1. Vía apoptótica extrínseca: “receptores de muerte”.

Existe una vía apoptótica mediada por la activación de los llamados “receptores de muerte” de la superfamilia de TNF-R, tales como FAS (CD95) o TNF-R1, entre otros (Locksley et al., 2001). Estos receptores se encuentran localizados en la membrana celular y transmiten la señalización apoptótica tras su interacción con diferentes ligandos específicos. Esto induce la activación del correspondiente receptor (Fig.II). La señalización se transmite a través de la región citosólica, que es capaz de interactuar con diferentes moléculas adaptadoras formando un gran complejo conocido como DISC. Este complejo es capaz de reclutar varias moléculas de pro-caspasa 8 que, debido a su proximidad, son capaces de procesarse y activarse unas a otras (Muzio et al., 1998). Éstas a su vez estimulan directamente a toda la cascada de caspasas efectoras (como la caspasa 3), que llevarían a cabo cortes específicos de sustratos proteicos desencadenando apoptosis de forma muy efectiva. Esta señal también puede ser amplificada en determinadas situaciones activando la vía mitocondrial a través de Bid, que se activa mediante corte proteolítico dando lugar a una forma truncada (*tBid*) (Chou et al., 1999; Li et al., 1998). *tBid* es un inductor de apoptosis muy potente, capaz de translocarse a la membrana mitocondrial e interactuar con miembros de la familia proteica Bcl-2 dando lugar finalmente a la permeabilización de la misma (Luo et al., 1998).

1.1.1. Vía mediada por el receptor FAS (CD95).

La unión del receptor de FAS a su ligando específico induce la trimerización del receptor. Éste posee en su región citoplasmática un dominio

de muerte (DD), que es el encargado de trasducir la señal mediante la interacción con proteínas adaptadoras como FADD. Éstas contienen a su vez un dominio efector de muerte (DED), encargado de transmitir la señal apoptótica directamente a las caspasas (Ehrenschrwender and Wajant, 2009; Strasser et al., 2009).

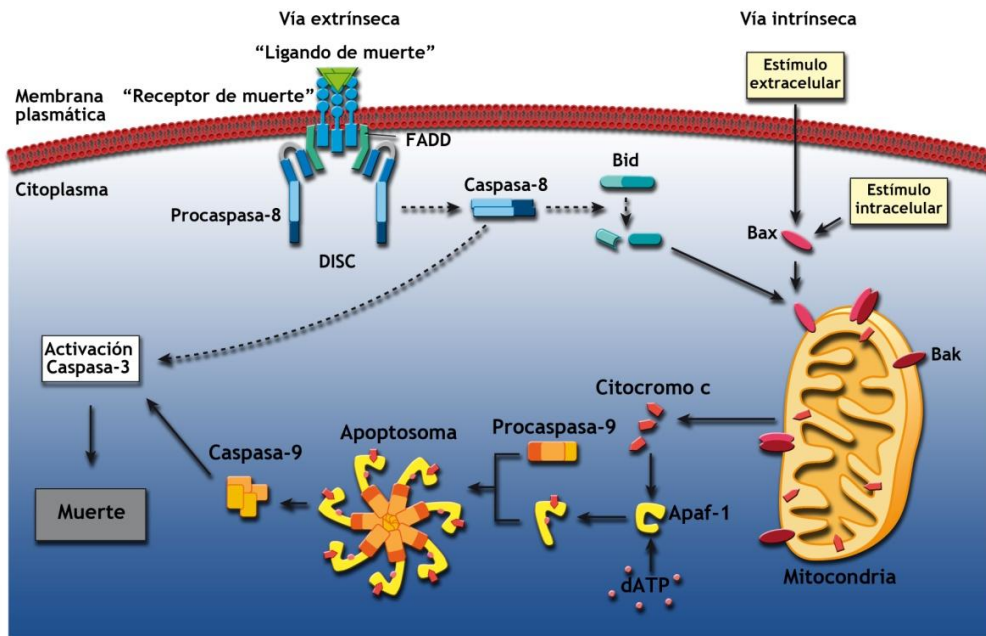


Fig. II: Esquema general de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. La conexión entre ambas puede realizarse a través del corte y activación de Bid. Adaptado de Whelan RS. y colaboradores, 2010 (Whelan et al., 2010).

1.1.2. Vía mediada por el receptor de TNF (TNF-R).

La activación de esta vía está mediada por la unión de TNF a receptores específicos (Van Herreweghe et al., 2010). Se han descrito dos tipos de TNF-R: TNF-R1, que se expresa en la mayoría de tipos celulares y está muy implicado en

las vías de señalización apoptóticas (Micheau and Tschopp, 2003) y TNF-R2 cuyo papel biológico aún es poco conocido.

Una vez activado por ligando, el receptor puede interactuar con moléculas adaptadoras como FADD o TRADD, reclutando a la caspasa 8 y desencadenando apoptosis celular por el mecanismo descrito previamente.

1.2. Vía apoptótica intrínseca: “Ruta mitocondrial”.

Esta vía puede servir para amplificar la señal de muerte celular generada a través de la vía extrínseca pero también puede activarse directamente en respuesta a estímulos apoptóticos intracelulares como daño en el ADN, estrés oxidativo, choque térmico y radiación ultravioleta o gamma, entre otros.

Estos estímulos apoptóticos generan una alteración del potencial de membrana mitocondrial, induciendo un aumento en la permeabilidad de la misma (Fig.II). Esto da lugar a la liberación de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma celular, como son el citocromo c, AIF, la endonucleasa Endo-G o Smac-DIABLO (Green and Reed, 1998). Además de la liberación de estos factores, la alteración del potencial de membrana mitocondrial también genera una pérdida de la homeostasis celular. Se produce una parada en la síntesis de ATP y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, se genera un complejo citoplasmático llamado apoptosoma, cuya estructura ha sido descrita recientemente (Teng and Hardwick, 2010). En su composición se incluye la caspasa 9, lo que induce su activación mediante un cambio conformacional (Hakem et al., 1998; Shi, 2006). De esta forma se desencadena la inducción de las caspasas efectoras (principalmente la caspasa 3), llevando irreversiblemente a la apoptosis celular (Pradelli et al., 2010).

1.2.1. La familia de proteínas Bcl-2.

De los genes implicados en la supervivencia celular de los mamíferos, Bcl-2 fue el primero que se descubrió y por ello da nombre a la familia (Tsujimoto et al., 1985) (Cleary et al., 1986). Se han descrito hasta 30 miembros de proteínas homólogas. Aunque participan en el mantenimiento de la homeostasis celular, en determinadas situaciones pueden también interactuar de forma dinámica para regular la apoptosis (Chipuk et al., 2010). El equilibrio entre los niveles de expresión de las proteínas pro- y anti-apoptóticas de esta familia así como la regulación de sus interacciones va a determinar la activación o no de los procesos apoptóticos (Youle and Strasser, 2008). Han sido agrupadas en tres clases dependiendo de su actividad y de sus dominios de homología con Bcl-2 (BH) (Fig.III):

- **Clase I:** proteínas anti-apoptóticas. Contienen los dominios BH1, 2, 3 y 4. Incluye Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1.
- **Clase II:** proteínas pro-apoptóticas efectoras que contienen dominios BH1, 2 y 3. Incluyen Bax y Bak, cuya oligomerización es esencial para que se produzca apoptosis por la vía mitocondrial (Lalier et al., 2007; Wei et al., 2001).
- **Clase III:** proteínas pro-apoptóticas que contienen sólo un dominio BH3 y son conocidas como proteínas “sólo BH3”. Recientemente se han establecido dos subclases dentro de este grupo. Por un lado estarían las “activadoras”, que pueden activar directamente a las proteínas pro-apoptóticas efectoras y por otro lado estarían las “sensibilizadoras”, que pueden interaccionar con distinta afinidad con los miembros anti-apoptóticos de la familia, modulando su función (Willis et al., 2007). Dentro de la clase III están incluidos Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa y Puma.

Generalmente las proteínas pro-apoptóticas son citosólicas pero durante la apoptosis, cambian su conformación, se integran en la membrana mitocondrial y oligomerizan (Wolter et al., 1997). Esto contribuye a la

permeabilización de la misma, generando la aparición de poros que permiten la salida de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma (Chipuk and Green, 2008). La composición y el mecanismo de formación de dichos poros en la membrana mitocondrial no se conocen completamente aunque se han propuesto diferentes modelos (Chipuk et al., 2006; Kroemer et al., 2007) (Ow et al., 2008). Por otro lado, los miembros anti-apoptóticos inhiben la activación de los miembros pro-apoptóticos, estabilizan el potencial de membrana mitocondrial, impidiendo la formación de poros y evitan el aumento de las especies reactivas oxidantes en las células (Green and Kroemer, 2004).

LA FAMILIA BCL-2

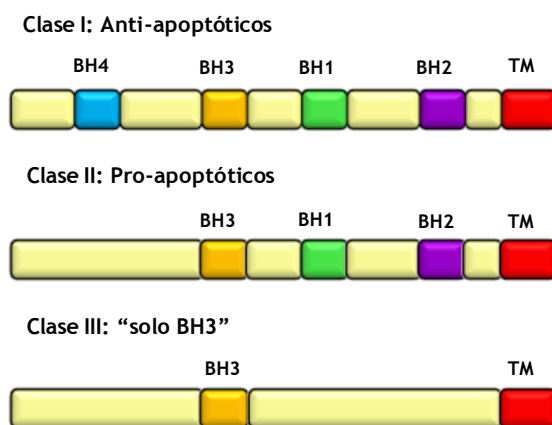


Fig.III: Esquema representativo de los miembros de la familia Bcl-2. TM: Dominio transmembrana.

Las modificaciones post-traduccionales de los miembros de la familia Bcl-2 y en particular la fosforilación de estas proteínas, juegan un papel muy importante en la regulación de la apoptosis. Pueden afectar a distintos niveles a su funcionalidad, incluyendo cambios conformacionales, modulación de las pautas de unión a otras proteínas, alteraciones en la localización subcelular así como modificaciones en sus tasas de degradación (Li et al., 1998; Zha et al., 1996).

1.2.2. Citocromo c.

En condiciones fisiológicas, el citocromo c se encarga del transporte de electrones desde el complejo III al complejo IV de la cadena mitocondrial, ayudando a generar un potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial interna. Este potencial es importante para generar ATP mediante respiración aeróbica y también se requiere para el transporte de proteínas y la biogénesis mitocondrial (Ow et al., 2008). La importancia de esta molécula en la vía de apoptosis mitocondrial se puso de manifiesto tras la aparición de diversos estudios en los que la microinyección de citocromo c en el citoplasma de varios tipos celulares de mamíferos inducía apoptosis (Li et al., 1997; Zhivotovsky et al., 1998).

Cuando se activa la vía de apoptosis intrínseca, esta proteína es liberada rápidamente al citoplasma debido a su bajo peso molecular (14 kDa). Una vez allí, se une con otras moléculas como Apaf-1, caspasa 9 y ATP para generar el apoptosoma (Rodriguez and Lazebnik, 1999) (Riedl and Salvesen, 2007).

1.2.3. AIF.

AIF es sintetizado como una proteína de 67 kDa que contiene una señal de localización mitocondrial en su extremo amino. Una vez que es importado a la mitocondria, esta señal es eliminada por diferentes peptidasas generando una proteína madura de 62 kDa (Otera et al., 2005). AIF queda anclado a la membrana mitocondrial interna por su extremo amino, donde posee actividad óxido-reductasa, jugando un papel fisiológico importante en la fosforilación oxidativa mitocondrial. En particular se encarga de modular la estructura y función del complejo I de la cadena respiratoria a la vez que protege a la célula frente al estrés oxidativo (Norberg et al., 2010). Por otro lado, su función en morfogénesis temprana es fundamental durante el desarrollo, por lo que ratones deficientes en AIF son letales a nivel embrionario (Joza et al., 2001).

En presencia de determinados estímulos apoptóticos, AIF es procesado por diferentes proteasas (principalmente calpaína-I) siendo liberado de su anclaje a la membrana y generando un fragmento proteico soluble de 57kDa. Este fragmento es liberado al citoplasma tras la permeabilización de la membrana mitocondrial, desde donde se dirige al núcleo, ya que contiene dos secuencias de localización nuclear. Una vez allí contribuye a la fragmentación del ADN y a la condensación de la cromatina (Susin et al., 1999). El mecanismo de acción de esta proteína en el núcleo sigue siendo desconocido pero se sabe que su translocación al mismo es un hecho fundamental para que induzca muerte celular (Cheung et al., 2006).

1.3. Caspasas.

Las caspasas son cisteína-proteasas fundamentales en casi todas las vías de señalización apoptóticas (Earnshaw et al., 1999). Su función principal es la degradación de proteínas celulares esenciales y su actividad catalítica es muy específica, ya que cortan únicamente tras residuos proteicos de aspartato (Alnemri et al., 1996). En mamíferos se han descrito 14 miembros diferentes de esta familia. Se sintetizan como zimógenos inactivos o pro-caspasas y tras su maduración son proteolíticamente procesadas formando caspasas activas. Pueden ser clasificadas como:

- Iniciadoras: incluyendo a las caspasas 2, 8, 9 y 10. Se activan en respuesta a distintos estímulos.
- Ejecutoras: incluyendo las caspasas 3, 6 y 7. Se encargan de la degradación de sustratos proteicos específicos.

Las caspasas se activan de forma secuencial, siendo las caspasas iniciadoras las que cortan y activan a las efectoras. Estas últimas amplifican la señal y ejecutan la muerte celular (Thornberry and Lazebnik, 1998).

1.4. Proteínas IAPs.

Las IAPs son una familia muy conservada de proteínas anti-apoptóticas de las que se han descrito varios miembros en mamíferos. Contienen entre uno y tres dominios BIR, que las capacitan para interactuar con caspasas, así como un dominio RING altamente conservado que posee actividad E3 ubiquitín-ligasa, lo que les permite catalizar la ubiquitinación de sustratos proteicos (Vaux and Silke, 2005). De esta forma pueden desencadenar directamente la degradación proteasomal de las caspasas, o incluso promover su auto-destrucción (Srinivasula and Ashwell, 2008). Puesto que alteraciones en las IAPs se han relacionado con distintos tipos de cáncer, se están desarrollando compuestos terapéuticos destinados a bloquear su acción e inducir así la apoptosis de las células tumorales. Algunos de ellos están siendo probados en ensayos clínicos para el tratamiento contra el cáncer (Gyrd-Hansen and Meier, 2010).

Un miembro principal de esta familia es X-IAP que contiene tres dominios BIR, por lo que es capaz de unirse a diferentes caspasas (3, 7 y 9) inhibiendo su actividad proteolítica (Galban and Duckett, 2010). Diversos estudios estructurales la señalan como el único miembro de la familia IAP en mamíferos que puede funcionar como inhibidor competitivo directo de la actividad enzimática de las caspasas mediante la unión a su sitio catalítico (Eckelman et al., 2006).

2. VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR.

2.1. Vía de las MAPKs: activación de ERK.

Las vías de las MAPKs pueden ser activadas por diversos estímulos, tanto extra como intracelulares, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, hormonas o diferentes tipos de estrés celular (Raman et al., 2007). Asimismo, regulan una amplia variedad de procesos celulares básicos como proliferación, diferenciación, supervivencia o muerte celular (Nishida and Gotoh, 1993; Seger

and Krebs, 1995). Alteraciones en su regulación dan lugar a numerosas patologías como Parkinson (Silva et al., 2005), Alzheimer (Marques et al., 2003) o distintos tipos de cáncer (Wan et al., 2004), entre otras (Kim and Choi, 2010). Estas proteínas son activadas mediante una serie de fosforilaciones en cascada, que amplifican y trasducen la señal desde la membrana celular al núcleo. Se han identificado diversos miembros de esta familia, siendo los más estudiados ERK, JNK y p38.

En condiciones basales, ERK permanece en el citoplasma unido a MEK, a la red de microtúbulos o a otras proteínas (Fukuda et al., 1997). Diferentes mitógenos inducen la rápida fosforilación y consecuente activación de esta proteína, que puede translocarse al núcleo de la célula y activar diversas cascadas de señalización (Khokhlatchev et al., 1998). Una vez finalizada su función se defosforila y regresa al citoplasma (Fig.IV).

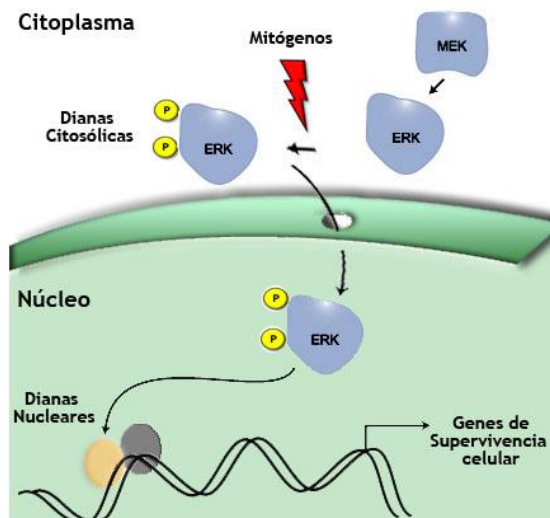


Fig.IV: Ruta esquemática de la activación de ERK. La fosforilación de esta MAPK induce su activación actuando sobre diversas vías de señalización tanto en el citosol como a nivel nuclear. Adaptado de Tsang y Dawid, 2004 (Tsang and Dawid, 2004).

Dependiendo de la duración y magnitud de la activación de ERK así como de su localización subcelular, esta proteína es capaz de regular por fosforilación diversas dianas tanto citosólicas como nucleares (Whitehurst et al., 2004; Yoon and Seger, 2006). Está ampliamente descrito que promueve la supervivencia celular tanto mediante la inactivación de proteínas componentes de la maquinaria apoptótica como activando la transcripción de genes de supervivencia (Balmano and Cook, 2009; Ballif and Blenis, 2001; Erhardt et al., 1999; Le Gall et al., 2000). Así, se sabe que puede promover la expresión (Boucher et al., 2000) o la actividad (Maurer et al., 2006) de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Mcl-1 y las IAPs o reprimir a los miembros pro-apoptóticos de la misma familia como Bad o Bim (Zha et al., 1996) (Fueller et al., 2008; Ley et al., 2004; She et al., 2002). Paradójicamente, han aparecido una serie de estudios muy recientes que indican que bajo determinadas condiciones, una activación aberrante o prolongada de ERK puede promover muerte celular (Cagnol and Chambard, 2010). Esto parece ser un mecanismo de control para evitar crecimiento o división celular incontrolados.

2.2. Vía de PI3K y Akt.

La PI3K es una quinasa que juega un papel fundamental a nivel celular regulando crecimiento y supervivencia, metabolismo, tamaño celular, respuesta inmune y comunicación intercelular (Kandel and Hay, 1999) (Wymann and Marone, 2005). Su función principal se basa en la fosforilación del segundo mensajero PI-4,5-P₂ a PI-3,4,5-P₃. Este paso es a su vez regulado negativamente por la fosfatasa PTEN (Stiles, 2009a).

La vía de PI3K se induce mediante la unión de diferentes factores de crecimiento y citoquinas a sus respectivos receptores en la superficie celular (Wymann and Marone, 2005). Como consecuencia, se produce la activación de proteínas diana y se genera una señalización en cascada que llega hasta el núcleo. Entre las proteínas activadas por esta vía, una de las mejor caracterizadas es Akt (también conocida como PKB) implicada en proliferación y

supervivencia celular (Datta et al., 1999). Akt puede ser fosforilada en dos residuos, Thr308 y Ser473. Ambos promueven su completa activación, pudiendo estimular vías de señalización muy diversas (Alessi et al., 1996). Entre las dianas directas de esta proteína se incluyen moléculas claves implicadas en apoptosis, como son las caspasas 3 y 9 o miembros de la superfamilia Bcl-2, sobre las que actuaría impidiendo la señalización apoptótica (Aslan and Thomas, 2009; Stiles, 2009b). En este sentido, Akt puede inhibir, por ejemplo, la función pro-apoptótica de Bad mediante su fosforilación, favoreciendo que permanezca secuestrada en el citoplasma (Datta et al., 1997). Así se evita su interacción con miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, que a su vez quedan libres para promover rutas de supervivencia celular (Masters et al., 2001; Scheid et al., 1999). Por el mismo mecanismo de acción, Akt puede bloquear la activación de Bax, impidiendo el cambio conformacional de dicha proteína así como su translocación a la mitocondria (Gardai et al., 2004; Yamaguchi and Wang, 2001). Además es capaz de inhibir apoptosis de forma indirecta, por ejemplo mediante la fosforilación de GSK3 β , impidiendo que ésta a su vez fosforile y degrade la proteína anti-apoptótica Mcl-1 (Kuo et al., 2001; Liu et al., 2001; Longo et al., 2008). Por tanto, estaría afectando al equilibrio de los miembros pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2.

2.3. Vía antioxidante mediada por Nrf-2 y HO-1.

El estrés oxidativo se origina en las células por una gran diversidad de estímulos que, a su vez, promueven la generación de especies reactivas oxidantes (principalmente derivadas de oxígeno). Esto supone un enorme impacto sobre la supervivencia, crecimiento o desarrollo pudiendo dar lugar a una gran cantidad de patologías asociadas. Por ello, es necesario que exista un estricto control celular sobre los niveles de estas especies reactivas, evitando su acumulación (Meneghini, 1997).

Entre las diferentes vías que se activan en respuesta al estrés oxidativo, una de las rutas de protección más importantes a nivel celular es la mediada por

el factor de transcripción Nrf-2 (Kang et al., 2005; Yanaka et al., 2005). Estudios llevados a cabo sobre los promotores génicos permitieron identificar una secuencia conocida como ARE que controla la expresión de genes antioxidantes, entre ellos todos los genes regulados por Nrf-2 (Fig.V) (Venugopal and Jaiswal, 1998; Wasserman and Fahl, 1997).

En condiciones normales, Nrf-2 permanece retenido en el citoplasma unido a la proteína inhibidora Keap1. Cuando se produce un aumento del estrés oxidativo a nivel celular, Nrf-2 se disocia de Keap1, se estabiliza y pasa al núcleo, potenciando la expresión de genes antioxidantes a través de su interacción con los elementos de respuesta ARE (Itoh et al., 1999; Zipper and Mulcahy, 2002). Se ha descrito que varias proteínas quinasas, entre ellas ERK, pueden modificar Nrf-2, induciendo su liberación de Keap1 (Zipper and Mulcahy, 2003) (Kang et al., 2007).

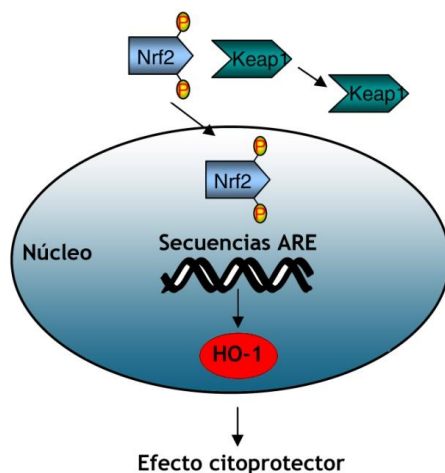


Fig.V: Esquema de la señalización mediada por Nrf-2 a nivel celular. Activación de la expresión de la enzima antioxidante HO-1.

Entre los principales genes diana activados por Nrf-2 se encuentran los genes de las HO, enzimas citoprotectoras cuya función básica es la degradación de los grupos hemo libres (Gozzelino et al., 2010). En humanos y roedores

existen dos isoenzimas: HO-1, cuya expresión se induce ubicuamente en respuesta a estrés oxidativo, y HO-2, que se expresa de forma constitutiva.

Se ha descrito que el factor de transcripción Nrf-2 es fundamental en su activación pero también otras vías como la de PI3K/Akt son capaces de inducir la expresión de HO-1 o modular su actividad (Kang et al., 2002) (Brunt et al., 2006).

3. LIPOXINAS: COMPUESTOS LIPÍDICOS RESOLUTIVOS.

La inflamación es una respuesta del organismo frente a las agresiones del medio que surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente nocivo, así como de reparar el tejido u órgano dañado. Durante la inflamación existe una producción y liberación a nivel local de una compleja diversidad de moléculas activas que se suceden en el tiempo (Serhan et al., 2007; Serhan and Savill, 2005). Las primeras células en llegar a la zona afectada son los neutrófilos, que destruyen el estímulo nocivo y mueren rápidamente vía apoptosis, debiendo ser eliminados a continuación (Nathan, 2006). Seguidamente, llegan a la zona los macrófagos (monocitos extravasados de la circulación sanguínea), que son células altamente especializadas cuya principal función es la fagocitosis. Una vez han limpiado la zona afectada, se lleva a cabo un cambio de señalización que induce el final de la inflamación en un proceso conocido como “fase de resolución” (Serhan, 2007). Esta fase es un proceso activo y estrictamente controlado en el eje temporal, que permite que los tejidos afectados recuperen la homeostasis, limitando un daño tisular excesivo y minimizando el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos (Nathan, 2002; Nathan and Ding, 2010). Se han identificado varios derivados lipídicos con potentes actividades biológicas, que son sintetizados activamente en dicha fase de resolución y que actúan de forma local (Levy et al., 2001). Entre estos productos destacan las lipoxinas, que son derivados del ácido araquidónico (AA) (Schwab and Serhan, 2006; Serhan et al., 1984b), así como las resolvinas y protectinas, más recientemente descritas y

cuyo precursor es un ácido graso distinto (Omega-3) (Schwab et al., 2007; Serhan et al., 2008b).

El AA es liberado de los fosfolípidos de la membrana celular por la acción de la fosfolipasa A₂, en respuesta a una gran variedad de estímulos. Una vez libre puede ser metabolizado por las ciclooxygenasas (COX) para generar prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs). Alternativamente, este ácido graso puede ser oxidado por la vía de las lipooxygenasas (LOX) generando leucotrienos (LTs) y lipoxinas (LXs) (Levy et al., 2001).

Se ha demostrado la presencia de niveles basales de lipoxinas en condiciones fisiológicas en diversos tejidos humanos, que aumentan considerablemente en las enfermedades inflamatorias. Se han detectado, por ejemplo, en lavados broncoalveolares de individuos con enfermedades pulmonares (Lee et al., 1990), en pólipos nasales (Edenius et al., 1990) o en nefritis (Papayianni et al., 1995).

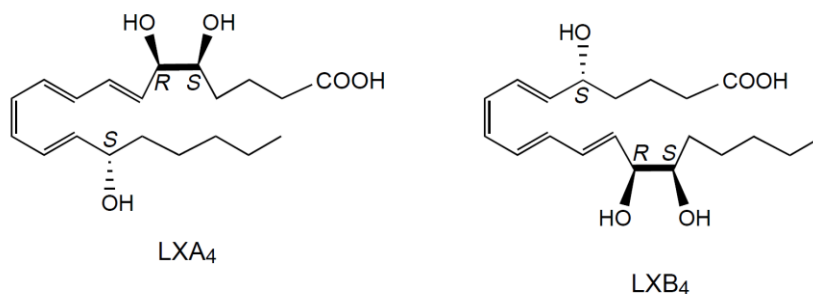


Fig.VI: Estructura de las lipoxinas. En las reacciones de biosíntesis se pueden generar dos isómeros posicionales como producto final: LXA₄ y LXB₄. Extraído de McMahon y colaboradores, 2001 (McMahon et al., 2001).

Las lipoxinas son rápidamente metabolizadas y transformadas en compuestos inactivos principalmente mediante la deshidrogenación en el carbono 15 (Clish et al., 2000). Por este motivo, se han desarrollado varios análogos estables con modificaciones específicas de las estructuras nativas de

las lipoxinas que los hacen más resistentes a la degradación (Serhan et al., 1995). Estos compuestos han sido ampliamente utilizados en los últimos años y parecen tener un gran potencial terapéutico en distintos modelos patológicos experimentales, aunque sus efectos actualmente son muy controvertidos (McMahon et al., 2001; Romano, 2005).

3.1. Lipooxigenasas (LOX).

Las LOX son una familia de enzimas dioxigenasas que comenzaron a ser estudiadas con detalle en los años 80 en leucocitos humanos por el grupo de Charles N. Serhan y sus colaboradores (Serhan et al., 1984b) (Samuelsson et al., 1987). Estas enzimas catalizan la incorporación de moléculas de oxígeno en átomos de carbono específicos utilizando como sustrato los ácidos grasos.

Las LOX, al igual que las COX, utilizan como sustrato el AA, generando dos productos finales, la lipoxina A₄ (LXA₄) y la lipoxina B₄ (LXB₄), de los cuales la LXA₄ es la que se ha estudiado de forma más extensa (Fig.VI). Se han aislado distintas LOX que inicialmente recibieron los nombres de 5-, 12 y 15- LOX, en función del carbono del AA que oxigenaban (Kuhn et al., 1986). Posteriormente, se descubrió que algunas de estas enzimas podían realizar oxigenaciones en puntos alternativos, por lo que la misma enzima podía generar más de un producto final (Kuhn and Thiele, 1999). Por ello, hace unos años se propuso una nueva clasificación según su homología de secuencia y sus propiedades enzimáticas (Kuhn, 2000), pero este aspecto aún se encuentra en debate.

Los estudios de distintas secuencias tanto en el genoma humano como en el de ratón han permitido realizar un análisis detallado de la estructura y organización de los genes de las LOX (Funk et al., 2002). Se han realizado diversos estudios con ratones deficientes en estos genes. Aunque dichos animales se desarrollan de forma correcta y llegan a ser adultos sanos, parecen ser más sensibles a procesos de inflamación aguda. Los estudios con ratones deficientes en 5-LOX en diversos modelos patológicos experimentales (Funk and Chen, 2000; Irvin et al., 1997) describen que la ausencia de dicha enzima no

presenta efectos claros en inflamación. Este resultado parece deberse a que la 5-LOX ejerce un papel dual, participando también según el contexto celular, en la síntesis de compuestos inflamatorios como los leucotrienos. No existen resultados definitivos sobre los efectos de la deficiencia de la 12-LOX en ratón aunque parece ser que estos animales poseen mayor tendencia trombótica (Johnson et al., 1998) así como defectos en la barrera acuosa cutánea (Johnson et al., 1998). Finalmente, diversos estudios en ratones deficientes en 15-LOX demostraron que esta enzima parece tener un importante papel en aterosclerosis, aunque sus mecanismos de acción tampoco están claros (Cyrus et al., 1999; George et al., 2001).

3.2. Biosíntesis de las lipoxinas.

Las lipoxinas se generan principalmente a través de la acción secuencial de dos enzimas que actúan en cascada. Se producen mediante un mecanismo conocido como “biosíntesis trascelular”, puesto que es necesaria la cooperación de varios tipos celulares para la generación del producto final (Serhan, 1997). Existen tres rutas biosintéticas importantes, que pueden darse de forma aislada o simultáneamente dependiendo del contexto celular (Kantarci and Van Dyke, 2003):

- Señalización iniciada por 15-LOX.

La primera ruta biosintética conocida implica la inserción de un oxígeno molecular en el carbono 15 del AA por la 15-LOX de monocitos y células epiteliales. Se genera como intermediario *15(S)-HETE*, que puede servir como sustrato para la 5-LOX de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN). El producto generado en esta última reacción tiene una vida media corta y se transforma rápidamente en LXA_4 o LXB_4 (Serhan et al., 1984a, b).

- Señalización iniciada por 5-LOX.

La segunda ruta se produce gracias a la interacción entre neutrófilos que poseen 5-LOX, y plaquetas, que tienen grandes cantidades de 12-LOX pero no son capaces de producir lipoxinas por sí mismas (Fig.VII) (Chiang et al., 2005). Los neutrófilos producen LTs como intermediarios, que son transformados por las plaquetas tanto en LXA₄ como en LXB₄ (Serhan and Sheppard, 1990).

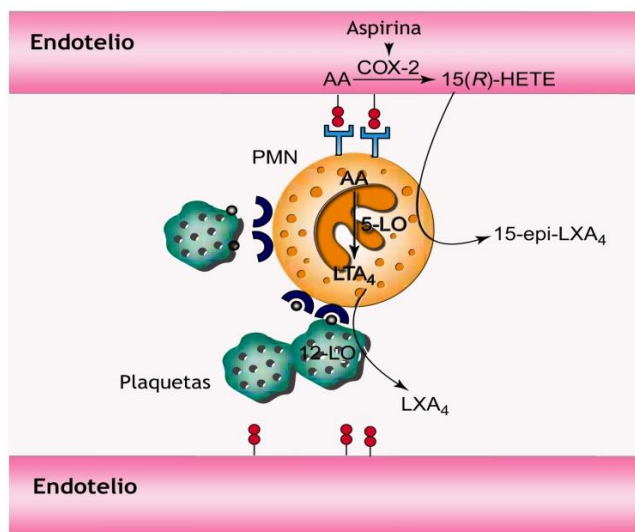


Fig.VII: Esquema de la ruta biosintética de las lipoxinas generada por biosíntesis trascelular. Está mediada por la cooperación entre las plaquetas y los neutrófilos PMN. En presencia de aspirina, la actividad de la enzima COX-2 cambia hacia la síntesis de 15-epi-LXA₄. Esquema adaptado de McMahon y colaboradores, 2001 (McMahon et al., 2001).

- Ruta de 15-epi-lipoxinas o lipoxinas derivadas de la aspirina (ATL).

En la tercera vía la enzima COX-2 es acetilada por la aspirina. Esto inhibe la síntesis de PGs y hace que la enzima genere en su lugar 15-(R)-HETE a partir del AA, el cual es liberado y transformado en 15-epi-lipoxinas por los leucocitos adherentes, que poseen 5-LOX (Claria and Serhan, 1995).

Los epímeros de lipoxinas generados a partir de la aspirina tienen una vida media más larga que los compuestos nativos y se calcula que aproximadamente su tasa de degradación es la mitad (Clish et al., 1999; Serhan et al., 1995). Esto es interesante puesto que, como la 15-epi-LXA₄ parece actuar a través del mismo receptor que la LXA₄ nativa, debería presentar efectos más prolongados debido a su mayor biodisponibilidad.

Se ha demostrado que las propiedades anti-inflamatorias de la aspirina se deben, en gran parte, a su capacidad para generar ATLs (Chiang et al., 2004), cuya formación ha sido detectada “*in vivo*” en varios modelos experimentales de inflamación como peritonitis (Chiang et al., 1998) o en sangre de pacientes asmáticos intolerantes a la aspirina (Sanak et al., 2000).

Estos compuestos son capaces de limitar la infiltración de PMNs y reducir la producción de mediadores pro-inflamatorios como PGs y quimioquinas. Esto mismo ocurre con otros medicamentos como los glucocorticoides, que son muy utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Perretti et al., 2002) o las estatinas, que aumentan los niveles miocárdicos de las 15-epi-lipoxinas, lo que podría explicar sus propiedades anti-inflamatorias (Birnbaum et al., 2006). Se han generado también análogos estables sintéticos de las 15-epi-lipoxinas que parecen ser capaces de inhibir de forma más efectiva que los compuestos nativos el reclutamiento de neutrófilos “*in vivo*” (Clish et al., 1999; Romano, 2005).

3.3. Receptor de las lipoxinas: ALX.

Aunque parecen existir diferentes mecanismos de acción de las lipoxinas, se ha descrito que son capaces de interactuar con un receptor específico de alta afinidad denominado ALX. Es un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G (GPCRs) para el que la LXA₄ es su ligando endógeno más potente (Chiang et al., 2006). Aunque inicialmente fue clonado como un receptor huérfano, se demostró que su ADN compartía una elevada homología de secuencia con los receptores FPR. Recientemente, la Unión Internacional de

Farmacología Básica y Clínica LXXIII ha establecido una nueva nomenclatura para los receptores de esta familia, donde ALX recibe como nombres alternativos FPRL-1 o FPR-2 (Ye et al., 2009).

Estos receptores se expresan en numerosos tipos celulares como neutrófilos (Fiore et al., 1994), monocitos (Maddox et al., 1997), células T activadas (Ariel et al., 2003), células del epitelio bronquial (Bonnans et al., 2003) o células mesangiales de riñón (McMahon et al., 2000). Asimismo, se ha determinado que ALX es capaz de interactuar con diferentes ligandos, entre los que se incluyen péptidos sintéticos y determinadas proteínas, que se unen a él con mucha menor afinidad que la LXA_4 (Chiang et al., 2000). Dependiendo del ligando con el que interaccione, el receptor es capaz de cambiar de señalización anti a pro-inflamatoria (Gronert et al., 1998). Parece ser que “*in vivo*” predominan las propiedades anti-inflamatorias, al menos durante respuestas fisiológicas (Fig.VIII).

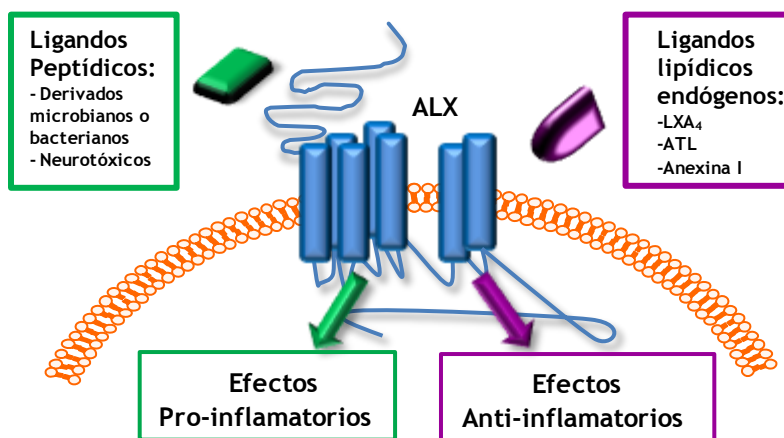


Fig.VIII: Efectos mediados por la interacción de ALX con diferentes ligandos. Dependiendo de los ligandos con los que interaccione este receptor, las acciones finales que se desencadenan pueden ser tanto anti como pro-inflamatorias.

Otro posible ligando de gran interés en medicina, que parece ser capaz de interactuar con el receptor ALX es la proteína anexina I, que se induce tras el

tratamiento con glucocorticoides como terapia anti-inflamatoria (Gavins et al., 2005; Perretti et al., 2002). Existen diversos modelos donde se ha demostrado que los glucocorticoides producen un aumento de la expresión de este receptor (Hashimoto et al., 2007; Sawmynaden and Perretti, 2006). Esto puede representar una redundancia funcional en los circuitos anti-inflamatorios celulares y puede suponer una nueva aproximación hacia futuras terapias combinadas.

3.4. Efectos biológicos de las lipoxinas.

En mamíferos las lipoxinas se generan fisiológicamente en el rango picomolar a nanomolar. Sus funciones y vías de señalización han sido y son actualmente objeto de estudio, principalmente las de la LXA₄. La LXB₄, cuyos efectos han sido menos estudiados, parece compartir acciones anti-inflamatorias con la LXA₄ pero se ha observado que no compite con ella por la unión al receptor (Chiang et al., 2005).

➤ Efecto anti-inflamatorio de las lipoxinas.

En los últimos años han aumentado los estudios sobre los efectos anti-inflamatorios de las lipoxinas en distintos modelos “*in vitro*”. Entre sus funciones más destacadas están:

- Inhibición del reclutamiento y activación de neutrófilos y eosinófilos en el rango nanomolar (Bandeira-Melo et al., 2000; Serhan et al., 1995).
- Estimulación directa de la expresión de genes relacionados con rutas anti-inflamatorias o resolativas (Qiu et al., 2001).
- Regulación de la activación del factor de transcripción NF-κB (Decker et al., 2009; Jozsef et al., 2002; Kopp and Ghosh, 1994).
- Estimulación de los macrófagos para que fagociten a los PMN apoptóticos del foco inflamatorio. Este efecto está asociado con un aumento en la liberación

de TGF- β por parte de los macrófagos, así como una bajada en los niveles de IL-8 y MCP-1 (Godson et al., 2000; Mitchell et al., 2002).

- Regulación de la organización del citoesqueleto en macrófagos mediante el ensamblaje de las moléculas de actina y miosina, promoviendo la polarización celular y la formación de filamentos y pseudópodos (Maderna et al., 2002; Reville et al., 2006).

- Reprogramación de la producción de citoquinas en los macrófagos induciendo un cambio fenotípico en estas células que dejarían de ser pro-inflamatorias (Mitchell et al., 2002).

- Acción antifibrótica de la LXA₄ en células mesangiales, controlando de esta forma la progresión de la enfermedad renal (Rodgers et al., 2005).

Todos estos trabajos indican que la LXA₄ posee una acción anti-inflamatoria y anti-fibrótica “*in vitro*”, y en este sentido tendría una gran utilidad terapéutica. Esto mismo parecen indicar los estudios realizados en diferentes modelos patológicos “*in vivo*”, como asma (Levy et al., 2002), dermatitis (Guilford et al., 2004; Schottelius et al., 2002), glomerulonefritis (Ohse et al., 2004) o periodontitis (Kantarci and Van Dyke, 2005), donde existe una notoria mejoría en los síntomas tras el tratamiento con lipoxinas.

➤ Papel de las lipoxinas como inmuno-moduladores en las infecciones.

Existen cada vez más evidencias del papel inmuno-modulador de estos compuestos lipídicos durante las infecciones producidas por la acción de distintos patógenos (Aliberti and Bafica, 2005). Así, se ha descrito que *Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito que codifica su propia 15-LOX, es capaz de activar la biosíntesis de LXA₄, modulando así la respuesta inmune del huésped (Aliberti et al., 2002; Bannenberg et al., 2004). Por otro lado, se ha visto que la acción de la LXA₄ como inhibidor de la síntesis de PGE₂ es utilizada por cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* para evitar la reparación de la membrana plasmática de los macrófagos, promoviendo la necrosis de estas

células inmunes y permitiendo así a la bacteria evadirse de los mecanismos de defensa del huésped (Divangahi et al., 2009).

➤ Papel de las lipoxinas sobre la apoptosis celular.

Cabe destacar que, mientras los efectos de las lipoxinas como compuestos anti-inflamatorios han sido objeto de numerosos estudios a lo largo de varias décadas, su papel en otros procesos celulares básicos como la apoptosis, fundamentales en su función resolutive, no se habían estudiado en profundidad. Los primeros trabajos en este sentido, que surgieron a finales de los años 90, indicaban que las lipooxigenasas parecían ser reguladores críticos de la supervivencia celular (Tang et al., 1996). En los años siguientes, aparecieron algunas publicaciones sobre su papel en apoptosis pero presentaban resultados muy diversos dependiendo del modelo celular empleado. Por ejemplo, el grupo de Goh y colaboradores, describió que la lipoxina en dosis nanomolares inhibía la apoptosis en células de la mucosa intestinal humana “*ex vivo*” (Goh et al., 2001). Años más tarde, apareció otro estudio en fibroblastos intersticiales renales de rata donde elevadas dosis de LXA₄ (rango micromolar) inducían apoptosis celular (Wu et al., 2005). Publicaciones más recientes describen un papel pro-apoptótico de las lipoxinas en neutrófilos, argumentando que este hecho potenciaría su papel resolutive puesto que la eliminación de estas células inmunes una vez finalizada su función, es un paso crítico para una resolución eficiente del proceso inflamatorio (El Kebir et al., 2008; El Kebir et al., 2007). Por el contrario, a pesar de que se conoce que una de las principales células diana de la acción de las lipoxinas son los macrófagos, al inicio de la presente Tesis Doctoral no se conocía el papel que podían jugar estos compuestos sobre la apoptosis de este tipo celular.

Objetivos

Basándonos en los antecedentes presentados en la Introducción, nos planteamos como hipótesis si la LXA₄ podría estar participando en la respuesta inmune a través de la modulación de la viabilidad de los macrófagos. Por tanto, los objetivos propuestos para el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Evaluar si la LXA₄ es capaz de modular la apoptosis de macrófagos murinos y humanos, inducida a través de distintos estímulos pro-apoptóticos. Analizar si esta respuesta está mediada por el receptor específico ALX.

2. Estudiar si las principales vías de señalización apoptóticas celulares (vía extrínseca y vía mitocondrial) se encuentran afectadas en los macrófagos tras el tratamiento con LXA₄.

3. Determinar las dianas moleculares de la LXA₄ en los macrófagos. Analizar de forma más concreta las rutas que se encuentran reguladas por la acción de dicho compuesto en los diferentes modelos de estudio.

Materiales y métodos

1. MATERIALES.

1.1. REACTIVOS.

La estaurosporina (Stau) fue comprada a Calbiochem (San Diego, CA, USA). La LXA₄ y su análogo, derivado de la aspirina, la 15-epi-LXA₄ fueron suministradas por Cayman (Ann Arbor, MI, USA). El inhibidor del proteasoma (MG132), el inhibidor de PI3K (LY294002) y de ERK (PD098059) fueron adquiridos en Calbiochem. El etopósido y el LPS (componente derivado de la pared bacteriana), fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). El GSNO, donador de NO fue adquirido en Alexis Biochemicals. Asimismo se utilizaron IFN γ y TNF- α que fueron suministrados por PeproTech (London, UK).

Para analizar la muerte celular mediada por FAS se usó un anticuerpo monoclonal contra su receptor, en este caso un clon denominado Jo2 que fue proporcionado por BD (San Jose, CA, USA). *N-t-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe* (Boc-2), el péptido antagonista del receptor de la lipoxina fue suministrado por Bachem (Switzerland).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron comprados a diversas casas comerciales indicadas en la tabla 1. Los anticuerpos secundarios fueron proporcionados por Pierce (contra ratón y conejo) y Sigma (para cabra). El anticuerpo secundario utilizado para la detección de AIF Alexa-Fluor 488, el Hoechst 33258 así como el reactivo Mito-tracker[®]Red CMXRos fueron suministrados por Molecular Probes (Eugene, OR, USA). La sonda fluorescente DAF-2 era de Cayman y la sonda DCFH de Sigma.

Los medios de cultivo eran de Gibco (Invitrogen), el suero fetal bovino (SFB) de Sigma y todo el material empleado en cultivo celular era de Falcon (Lincoln Park, NJ) o TPP (Switzerland). Para las transfecciones celulares se utilizó la solución V para nucleofectar de Amaxa (Lonza, Germany).

La extracción de ARN se realizó con TRIzol[®] de Invitrogen, el kit utilizado para la RT-PCR así como los cebadores empleados para la técnica de PCR

cuantitativa fueron de Invitrogen y el SYBR[®] Green utilizado era de Applied Biosystems.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial
AIF	sc-5586	Santa Cruz
Akt	9272	Cell Signaling
β -actina	A 5441	Sigma
Bax	2772	Cell Signaling
Bcl-2	ab7973	Abcam
Citocromo c	556433	BD Biosciences
ERK	9102	Cell Signaling
HO-1	AB1284	Chemicon
JNK	sc-571	Santa Cruz
Lamina B	sc-6217	Santa Cruz
Mcl-1	sc-819	Santa Cruz
Nrf-2	sc-13032	Santa Cruz
p38	9212	Cell Signaling
p85	06-195	Upstate
P-Akt Ser473	4060	Cell Signaling
P-ERK	9101	Cell Signaling
P-JNK	9251	Cell Signaling
Porina	A31855	Invitrogen
P-p38	9211	Cell Signaling
x-IAP	610762	BD Biosciences

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados para “Western blot” e inmunofluorescencia.

1.2. ANIMALES.

Todos los animales utilizados en el presente trabajo fueron mantenidos y tratados de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Ético para la Investigación con Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” en consonancia con las directivas europeas 86/609/EEC y 2003/65/EC.

Para la obtención de macrófagos peritoneales se utilizaron ratones BALB/c machos, de entre 8 y 10 semanas, libres de parásitos específicos, suministrados por Charles River y mantenidos en condiciones controladas de luz, presión y temperatura, permitiéndoles el acceso de agua y comida “*ad libitum*”.

Los ratones deficientes en Nrf-2 (Nrf2^{-/-}) y los correspondientes controles (Nrf-2^{+/+}), ambos con un fondo genético C57BL/6, fueron cedidos generosamente por el Dr. Antonio Cuadrado (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España).

2. MÉTODOS.

2.1. CULTIVO CELULAR.

Durante la realización de este trabajo se utilizaron líneas celulares y cultivos primarios murinos y humanos.

La manipulación y siembra de células se realizó bajo campana de flujo laminar Telstar modelo PV-100. Las células fueron mantenidas en un incubador de células Heraeus con un 5% de CO₂ a saturación de humedad.

2.1.1. Cultivo de líneas celulares.

Se trabajó con la línea celular murina de fenotipo macrofágico **RAW 264.7**. Las células se sembraron a $6-8 \times 10^4$ cel/cm² en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, L-glutamina 2 mM y antibióticos (50 µg/ml de penicilina, estreptomicina y gentamicina). Previamente a las estimulaciones, las células RAW 264.7 se lavaron con PBS y se reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 suplementado con un 1% de SFB.

La línea celular monocítica humana **THP-1** se mantuvo en las mismas condiciones que las células RAW 264.7. La diferenciación de estas células a macrófagos se logró mediante el tratamiento de las mismas durante 48 h con PMA a una concentración de 50 nM.

2.1.2. Cultivo de células primarias murinas.

- Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales.

Cuatro días antes de la extracción de los macrófagos se administró a los ratones 2,5 ml de caldo de tioglicolato (3% p/v) (Difco) mediante inyección intraperitoneal para estimular la producción de células de tipo macrofágico. Pasado este tiempo se sacrificaron los animales por saturación del ambiente con

CO₂. Se les retiró la piel de la cavidad abdominal y se inyectaron 10 ml de medio RPMI 1640 frío a cada animal. Tras aplicar un suave masaje a la zona, se recuperó el medio de la cavidad abdominal y se centrifugó a 1100 rpm a 4 °C durante 5 min. El precipitado obtenido, constituido por macrófagos y linfocitos, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y antibióticos. Las células se sembraron (10^6 cel/cm²) y se mantuvieron durante 3 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se retiró el sobrenadante y se lavaron los platos con PBS frío con el fin de eliminar las células no adheridas a la placa (linfocitos). Al menos 12 h antes de estimular los macrófagos, el medio se substituyó por RPMI 1640 con 1% SFB.

2.1.3. Cultivo de células primarias humanas.

- Aislamiento y cultivo de monocitos de sangre humana.

Las células mononucleares de sangre periférica (PMBC) fueron aisladas de la sangre de donantes adultos sanos. Se realizó un lavado inicial de las muestras sanguíneas con PBS, se centrifugaron a 1800 rpm 10 min y se desechó el suero. A continuación se generó un gradiente celular en ficoll (Ficoll-Hypaque Plus, Amersham Bioscience, Holland) por centrifugación a 2000 rpm durante 30 min. Tras este paso se separaron las células de la fase intermedia, que corresponden a las PMBC y fueron cultivadas durante 2 h a una densidad inicial de 10^6 cels/ml en DMEM sin suero y en presencia de antibióticos (100 µg/ml penicilina y estreptomicina). Pasado ese tiempo se eliminó el sobrenadante y las células adherentes (mayoritariamente monocíticas) fueron cultivadas en el mismo medio con un 10% SFB. Al día siguiente se aspiró el medio de cultivo y se procedió a la diferenciación de monocitos a macrófagos mediante tratamiento con 20 ng/ml de M-CSF recombinante humano (Peprotech) durante siete días, renovando el medio de cultivo cada dos días. Una vez que las células estaban diferenciadas se procedió a las estimulaciones correspondientes.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para los experimentos de citometría de flujo las muestras se procesaron en un citómetro modelo Cytomics FC500 de Beckman-Coulter y los datos fueron analizados con el programa informático MXP de la misma casa comercial.

2.2.1. Análisis de la fragmentación del ADN con ioduro de propidio.

Las células fueron sembradas y mantenidas como se ha descrito previamente y recibieron los diferentes estímulos indicados en cada caso. Finalizado el tratamiento, fueron recogidas en tubos de citómetro añadiendo PBS frío. Seguidamente las muestras se centrifugaron a 1000 rpm 5 min a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y se añadió a cada tubo 400 µl de buffer de lisis (citrato de sodio 1%, Triton X-100 1%) con ioduro de propidio (IP) (Sigma) a una concentración final de 100 µg/ml. Se emplearon unas longitudes de onda de excitación 493 nm/ emisión 630 nm para la detección del IP.

2.2.2. Análisis de la apoptosis temprana con anexina V.

Para detectar procesos de apoptosis temprana, se recogieron las células como se ha descrito en el apartado anterior y tras la centrifugación se incubaron con 100 µl de anexina V-FITC preparada en su tampón de unión específico (ambos de BD Pharmingen) en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente (TA). A continuación se añadió PBS hasta un volumen final de 500 µl con IP 100 µg/ml y se procedió al análisis de las muestras. Las longitudes de onda empleadas para la detección de anexina V fueron de excitación 490 nm/ emisión 514 nm.

2.3. ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para determinar los niveles de estrés oxidativo, medimos por un lado la producción de NO, utilizando como sonda DAF-2. Este compuesto difunde pasivamente a través de las membranas celulares y una vez dentro de las células reacciona con el NO, generando como resultado un reactivo fluorescente de color verde. Tras los tratamientos pertinentes, las células fueron incubadas con DAF-2 a una concentración de 200 μ M durante 30 min a 37 °C. Pasado ese tiempo se centrifugaron a 1000 rpm 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS. Finalmente las muestras se incubaron con IP para determinar viabilidad celular.

Por otro lado se cuantificó la liberación de especies reactivas del oxígeno utilizando la sonda DCFH, muy útil en la detección y cuantificación del peróxido de hidrógeno intracelular. Este reactivo se añadió a una concentración final de 0,4 μ M y se incubó a 37 °C 30 min. Las células fueron recogidas en tubos de citómetro, centrifugadas y resuspendidas en PBS con IP para su análisis por citometría.

2.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES.

Las células fueron resuspendidas en un tampón de lisis (CHAPS 0,5%, Tris HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5 mM) al que se añadieron extemporáneamente una combinación de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma, 1 μ l/ml). Las muestras se mantuvieron 15 min en hielo y posteriormente se agitaron vigorosamente durante 30 min a 4 °C. A continuación se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min y los sobrenadantes se recogieron como extractos totales y fueron almacenados a -80 °C. Para la correcta extracción proteica, las muestras fueron mantenidas a 4 °C durante todo el proceso.

2.5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS.

Las células se resuspendieron en tampón BH frío (HEPES 10 mM pH 8, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) al que se añadió extemporáneamente la combinación de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma, 1 μ l/ml) y Nonidet NP-40 0,5%. Tras la incubación en hielo durante 15 min, las muestras se agitaron vigorosamente durante 10 s y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min. El sobrenadante ó extracto citosólico, se almacenó a -20 °C.

Al precipitado nuclear se le añadió tampón BC frío (HEPES 20 mM pH 8, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 20%), al que se añadieron previamente los cócteles de inhibidores mencionados anteriormente. El tubo se agitó suavemente a 4 °C durante 30 min, y posteriormente, se centrifugó 15 min a 13000 rpm. El sobrenadante (extracto nuclear) se congeló a -80 °C. Para la correcta extracción proteica, las muestras fueron mantenidas a 4 °C durante todo el proceso.

2.6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS ENRIQUECIDOS EN MITOCONDRIA.

Las células se resuspendieron en un tampón específico (sacarosa 320 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, al que se añadieron previamente los cócteles de inhibidores de fosfatasa y proteasas) y se homogeneizaron mediante pases repetidos a través de una aguja de 27-G generando un extracto proteico total. Estas muestras se centrifugaron en primer lugar a 1500 rpm 10 min a 4 °C para eliminar en los precipitados los núcleos y otras fracciones celulares densas y a continuación a 10000 rpm 15 min a 4 °C salvando los sobrenadantes como extractos citosólicos. Seguidamente se añadió de nuevo este mismo tampón a los precipitados y las muestras se agitaron vigorosamente. Para finalizar se centrifugaron a 13000 rpm 5 min a 4 °C y los sobrenadantes

fueron considerados como “fracciones mitocondriales”, que se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.

La determinación de la concentración proteica de los diferentes extractos se cuantificó en un lector de placas ATOM 340 ATC (SLT Lab Instruments). Las medidas se realizaron según el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina de suero bovino como patrón. Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie, con grupos amino libres presentes en los aminoácidos básicos de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

2.8. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOT”.

2.8.1. Electroforesis y transferencia.

Las proteínas se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes, utilizando geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1) a distintos porcentajes (10-12%) según el peso molecular de la proteína diana (Laemmli, 1970). Los extractos de proteínas se calentaron a 95 °C durante 8 min en el tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%). Se cargaron los geles con cantidades iguales de proteína de cada muestra y se sometieron a corriente eléctrica en cubetas de electroforesis de BioRad a TA.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron en frío a membranas Hybond®-PVDF (Amersham) en un tampón de transferencia constituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8,3 durante 2 h a 400 mA.

2.8.2. Inmunodetección.

Con el fin de saturar los sitios de unión inespecífica, las membranas se mantuvieron durante 1 h a TA en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS. Transcurrido este tiempo, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos, durante toda la noche a 4 °C. A continuación las membranas se lavaron con T-PBS (PBS y Tween-20 0,1%) y fueron expuestas a los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Finalmente y tras realizar los lavados correspondientes, el revelado se llevó a cabo empleando reactivos ECL[®] (Amersham) en un analizador de imágenes acoplado a una cámara (Gel-Doc, BioRad). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría utilizando el programa informático Quantity One (BioRad).

Las membranas fueron sometidas a incubaciones sucesivas con diferentes anticuerpos tras ser tratadas con tampón PBS con SDS 2%, suplementado con β -mercaptoetanol (100 mM) durante 30 min a 60 °C y en continua agitación.

2.9. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES CELULARES.

2.9.1. Transformación de bacterias competentes.

Para la amplificación de los plásmidos se utilizaron bacterias Subcloning Efficiency DH5 α [®] Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen). Las bacterias se descongelaron en hielo y se tomó una alícuota de 100 μ l para cada transformación. Directamente se añadieron 10 ng de ADN plasmídico a las bacterias y se mezclaron con agitación suave sin pipetear. Tras incubación en hielo durante 30 min se sometieron a un choque térmico en un baño a 37 °C durante 1 min. Inmediatamente después los tubos se pusieron de nuevo en hielo durante 5 min y tras este tiempo se añadió 1 ml de medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico y se mezcló suavemente. Los tubos se incubaron en un baño a 37 °C

durante 1 h. De cada tubo de transformación se tomaron 100 µl y se sembraron en una placa de LB-agar con el antibiótico de selección (ampicilina). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

2.9.2. Crecimiento de bacterias transformadas y purificación de plásmidos.

Transcurrido el tiempo necesario para el crecimiento de las colonias resistentes al antibiótico en las placas de agar, se seleccionó una única colonia y se inoculó con ella un tubo con 2 ml de LB con ampicilina 100 µg/ml y se dejó crecer durante 2 h a 37 °C en agitación. Seguidamente se transfirió 1 ml de dicho cultivo a un matraz con 200 ml de LB con ampicilina, permitiendo el crecimiento bacteriano durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos bacterianos se centrifugaron a 5000 rpm 5 min, se decantó el sobrenadante y partiendo de los precipitados se purificaron los plásmidos con el kit EndoFree®-Plasmid Maxiprep (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN obtenido se cuantificó en un Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies) y los plásmidos purificados se guardaron a -20 °C.

2.9.3. Transfección de células y ensayos de actividad luciferasa.

Las células RAW 264.7 fueron transfectadas con el plásmido ARE-Luc (cedido generosamente por el Dr. Antonio Cuadrado) que tiene varias copias del elemento de respuesta antioxidante unido al gen de la luciferasa. Como plásmido control utilizamos un pGL3 basic facilitado por este mismo grupo.

Para llevar a cabo las transfecciones, 5×10^6 células fueron resuspendidas en 100 µl de la solución de nucleofección V de Amaxa (Lonza). Seguidamente se añadieron 2 µg del ADN plasmídico correspondiente y se procedió a la transfección utilizando un programa específico para este tipo celular en el Nucleofector® Device de Amaxa. Inmediatamente después se añadieron 900 µl de medio de cultivo a la cubeta y se recogieron las células, sembrándolas en

placas de 48 pocillos. A las 8 h se cambió el medio de cultivo y las células se dejaron reposar durante 18 h más en el incubador. Una vez finalizados los estímulos, se lisaron las células y se incubaron con el sustrato de la luciferasa siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega). La cantidad de luz liberada fue cuantificada en cada punto en un luminómetro GloMax[®] 96 de placa (Promega).

2.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CASPASA.

2.10.1. Determinación “*in vitro*” mediante fluorimetría.

Extractos proteicos totales se incubaron a una concentración final de 1 mg/ml con los correspondientes sustratos fluorescentes (20 μ M) durante 1 h a TA. Para caspasa 3 se utilizó el Ac-DEVD-AMC (BD Pharmingen), para caspasa 8 el Ac-IETD-AFC (BD Pharmingen) y para caspasa 9 Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC (Bachem). La reacción se llevó a cabo en oscuridad y con una leve agitación. Pasado ese tiempo se midió la actividad en un fluorímetro modelo Fluoroskan Ascent (Labsystems), utilizando para caspasa 3 unas longitudes de onda de excitación/emisión de 340/460 nm y para las caspasas 8 y 9 400/480 nm.

2.10.2. Determinación “*in vivo*” mediante CaspGLOW[®].

Para la determinación de la actividad “*in vivo*” de las caspasas se utilizaron kits de tinción CaspGLOW[®] (Biovision Research, USA). Las células se estimularon y fueron incubadas directamente con el reactivo fluorescente durante 1 h a 37 °C en oscuridad. En todos los experimentos se llevó a cabo un control con el inhibidor de caspasas Z-VAD (1 μ g/ml), suministrado por el fabricante. Las células se levantaron mediante un suave pipeteo y de forma inmediata se procedió a visualizarlas en un microscopio confocal modelo Espectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). Las imágenes se adquirieron con el programa informático “Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite

1.81", de la misma casa comercial y fueron analizadas con Image J. Para determinar el número total de células en cada campo y cuantificar el número de células activadas, realizamos tinciones nucleares adicionales con el colorante Hoechst (1:500).

2.11. INMUNOFUORESCENCIA.

Las células se sembraron en placas de 8 o 16 pocillos (Chamber Slides, Falcon) a una densidad celular de 3×10^4 por pocillo en 300 μ l de medio. Se realizaron los estímulos oportunos y a continuación las células fueron marcadas con el colorante Mito-tracker CMX Ros (1:500) 30 min, para la detección mitocondrial. Seguidamente se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 min a TA. Tras un doble lavado con PBS, las células fueron permeabilizadas con metanol frío 5 min a TA. A continuación se lavaron de nuevo y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 3% durante 30 min antes de incubarlas con el anticuerpo primario 18 h a 4 °C (AIF, 1:100). Al día siguiente se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y se incubaron las células con el anticuerpo secundario (1:500) durante 30 min a TA. Finalmente se lavaron de nuevo todos los pocillos y se montaron las muestras con un gel de montaje especial para fluorescencia Vectashield® (Vector Labs).

Las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal de Leica como se menciona en el apartado anterior. Para la determinación del coeficiente de colocalización se utilizó el programa Image J.

2.12. PCR CUANTITATIVA (*qPCR*).

2.12.1. Aislamiento del ARN.

Las células (8×10^6) se lavaron con PBS frío y se procedió a la extracción del ARN utilizando el reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen) según las instrucciones del proveedor. Las muestras se transfirieron a tubos de polipropileno de 1,5 ml

tratados con DEPC, se añadieron a cada muestra 200 µl de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 s. Posteriormente se mantuvieron 15 min a TA y se centrifugaron durante otros 15 min a 13000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de isopropanol. Una vez precipitado el ARN, se centrifugaron las muestras 15 min a 13000 rpm 4 °C y se decantó el sobrenadante con cuidado. El precipitado se lavó varias veces con etanol 70% y finalmente se resuspendió en agua ultrapura estéril. La concentración y pureza de los ARNs obtenidos se cuantificó utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

2.12.2. Retrotranscripción (RT).

Por medio de la enzima retrotranscriptasa inversa, el ARN obtenido mediante el protocolo anterior fue copiado a cADN (ADN complementario). Este proceso se llevó a cabo utilizando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). En todo momento se siguieron las recomendaciones del proveedor y la reacción se desarrolló en un termociclador MyIQ (Biorad).

Se tomó 1 µg de cada uno de los ARNs purificados y se le añadió 1 µl de “*random hexamers*” o cebadores de secuencia aleatoria (50 ng/µl) y 1 µl del cóctel de dNTPs, llevando posteriormente cada muestra a un volumen final de 10 µl con agua estéril. Se incubaron los tubos durante 5 min a 65 °C y posteriormente a 4 °C durante 1 min. A continuación se añadió a cada tubo 10 µl del cóctel de síntesis de cADN (2 µl tampón RT 10x, 4 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl DTT 0.1 M, 1 µl RNaseOUT® (40 u/µl) y 1 µl de la enzima retrotranscriptasa SuperScript® III (200 u/µl)). Seguidamente los tubos se agitaron y se incubaron durante 10 min a 25 °C, y posteriormente, durante 50 min a 50 °C. Para detener la reacción se calentaron las muestras 5 min a 85 °C y a continuación se enfriaron rápidamente en hielo.

Finalmente, para eliminar posibles trazas de ARN se les añadió 1 µl de RNasa H a cada uno de los tubos y se mantuvieron a 37 °C durante 20 min. Los cADNs se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

2.12.3. PCR cuantitativa (qPCR).

Para llevar a cabo los ensayos de *qPCR* se tomaron 5 µl de cada uno de los cADNs obtenidos en la reacción de RT, se añadieron 10 µl del cóctel comercial *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y 250 nM de cada uno de los cebadores “sentido” y “antisentido” para el gen de interés, llevando posteriormente cada muestra a un volumen final de 25 µl con agua estéril. Para la normalización de los datos se empleó un gen correspondiente a una subunidad ribosómica cuya expresión no se ve modificada por los diversos tratamientos utilizados (36B4 ó Arbp). En cada caso se realizaron triplicados tanto para los genes diana como para el gen de referencia.

Las secuencias de los cebadores específicos utilizados en el presente trabajo fueron diseñadas utilizando el programa informático Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y sintetizadas por Isogen (Tabla 2). Se corroboró la secuencia homóloga de hibridación de los cebadores para que fuesen únicas en el genoma murino mediante el uso de la herramienta informática BLAST (NCBI). Para cada gen calculamos y evaluamos la curva de disociación para confirmar que nuestros cebadores eran realmente específicos de nuestro gen y amplificaban una única secuencia.

La reacción de *qPCR* se llevó a cabo en un termociclador modelo MyIQ (Biorad) y el análisis de los resultados se realizó utilizando el programa informático IQ5 de la misma casa comercial. Se cuantificó la expresión relativa de cada una de las muestras frente al control, normalizando previamente con el gen de referencia 36B4 mediante el método del $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Sentido (5' a 3')	Antisentido (5' a 3')
Bcl-2	CTTAGAAAATACAGCATTGCGGAG	GGATGTGCTTTGCATTCTTGG
Bax	GGAAGGCCTCCTCTCCTACTTC	GGTGAGGACTCCAGCCACAA
Mcl-1	AAAGAGGCTGGGATGGGTTT	CAAAAGCCAGCAGCACATTTC
X-IAP	GGCAGATTATGAAGCACGGATC	GGCTTCCAATCAGTTAGCCCTC
36B4	AGATGCAGCAGATCCGCAT	GTTCTTGCCCATCAGCACC

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados en *qPCR*.

2.13. ESTADÍSTICA.

Los valores representados en las distintas gráficas expresan la media aritmética \pm el error estándar de la misma. Para las comparaciones estadísticas se emplearon los tests “*t de Student*” o ANOVA dependiendo de cada caso. Se consideraron significativas las diferencias con un valor $p \leq 0,05$.

Resultados

1. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ EJERCE UN PAPEL PROTECTOR FRENTE A LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RAW 264.7.

1.1. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la apoptosis inducida por estaurosporina en RAW 264.7.

Actualmente existe una gran controversia sobre los efectos de las lipoxinas en apoptosis, que parecen depender del tipo celular analizado. Puesto que nuestro interés se centra en las células del sistema inmune y la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en neutrófilos, decidimos analizar su papel sobre macrófagos.

Para determinar el efecto de la LXA₄ sobre la supervivencia de estas células, se utilizó una línea celular macrofágica de ratón, RAW 264.7. Como inductor de apoptosis se usó estaurosporina (Stau), cuyos efectos han sido ampliamente descritos en diversos modelos. Este compuesto es capaz de inducir apoptosis tanto por vía extrínseca como por vía mitocondrial, aunque su efecto parece ser más potente en la activación de esta última. Considerando datos previos de nuestro grupo, se estableció que la concentración óptima de este compuesto a la que se produce una apoptosis notable pero reversible, era de 200 ng/ml (Hortelano et al., 2002). Se comprobó que el tratamiento de las células RAW 264.7 durante 16 h ocasionaba una apoptosis en estas células de aproximadamente un 40% respecto a la población celular total (Fig.1A). Este efecto fue estadísticamente significativo ($p \leq 0,001$) en todos los casos analizados. Tras la obtención de estos resultados se decidió utilizar Stau a 200 ng/ml en el resto de experimentos realizados en esta Tesis Doctoral.

Posteriormente se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de LXA₄ (dentro del rango nanomolar) analizando su efecto sobre la apoptosis temprana mediante la cuantificación del número de células positivas para anexina V. Como control se utilizó su vehículo, etanol, que no presentaba efectos tóxicos a las concentraciones utilizadas (Fig.1A). Puesto que existía cierta controversia en la bibliografía sobre el momento de adición de la

lipoxina respecto al estímulo apoptótico, en nuestro ensayo se utilizaron tres condiciones diferentes. Por un lado, se añadió LXA₄ al mismo tiempo que la Stau y por otro se realizaron pre-tratamientos donde se añadía una o dos horas antes. Se determinó que en ausencia de Stau no existían diferencias notables entre los distintos grupos, manteniéndose niveles de apoptosis por debajo del 10% de la población celular total. Por el contrario, en su presencia el efecto inhibitor más notable se detectaba si la LXA₄ era utilizada como un pre-tratamiento, añadida a las células 2 h antes (Fig.1B). En este caso, en las condiciones controles se obtuvo un porcentaje de apoptosis celular cercano al 5%, resultado que se mantenía en el caso de los tratamientos únicamente con LXA₄. La Stau indujo un aumento muy significativo de la apoptosis, alcanzando valores cercanos al 40% de la población celular total. En cambio, concentraciones de LXA₄ superiores a 100 nM ocasionaban una inhibición significativa de dicho efecto. Se determinó que la dosis EC₅₀ de LXA₄ en este modelo era 250 nM puesto que inhibía aproximadamente al 50% el efecto apoptótico de la Stau. Considerando estos resultados iniciales, se estableció que los pre-tratamientos con LXA₄ serían de 2 h a 250 nM a lo largo del resto de ensayos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, siempre que no se indique lo contrario.

A continuación, para corroborar los resultados previos, se analizó por citometría de flujo la fragmentación del ADN celular como marcador adicional de apoptosis (Fig.1C). Se determinó que tanto en células control como en las que solamente fueron estimuladas con LXA₄, la fragmentación del ADN era de aproximadamente un 8%. El tratamiento con Stau inducía una fragmentación superior al 40% y de acuerdo con los resultados previos, el pre-tratamiento con LXA₄ produjo una inhibición de la misma hasta alcanzar valores finales cercanos al 20%. Así, nuestros resultados indicaban un destacado efecto protector de la LXA₄ frente a la apoptosis inducida con Stau en la línea celular RAW 264.7.

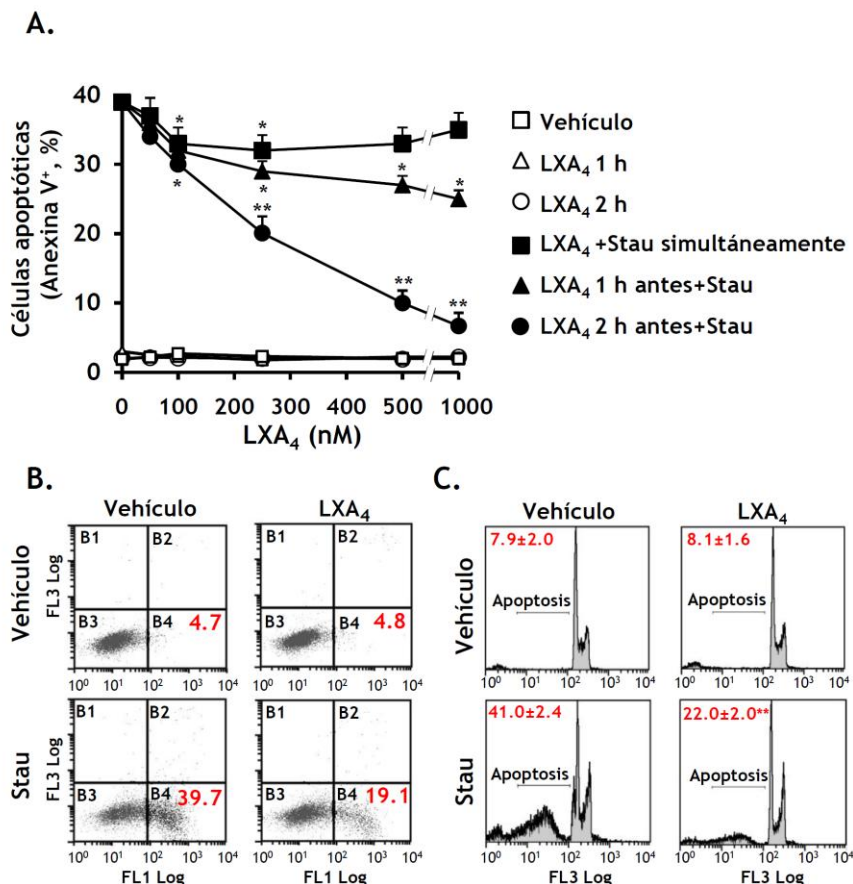


Fig.1. Reducción de la apoptosis inducida con Stau en RAW 264.7 mediada por la LXA₄. **A.** Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de LXA₄, que se añadió 1 ó 2 h antes o de forma simultánea al estímulo apoptótico. El porcentaje de células apoptóticas fue estimado mediante marcaje celular con anexina V por citometría de flujo. **B.** Ejemplo representativo del gráfico de puntos obtenido en el citómetro tras el tratamiento de las células con LXA₄ a 250 nM 2 h antes de la adición de Stau (200 ng/ml, 4 h). En color rojo se muestran los porcentajes de células apoptóticas detectados. FL1 corresponde al detector utilizado para la cuantificación de anexina V y FL3 para el IP. El gráfico está dividido en cuatro regiones donde B3 representa una población celular sin marcaje, B1 y B4 son positivas sólo para IP o anexina V respectivamente, mientras que B2 corresponde a células con doble marcaje. **C.** Las células fueron tratadas como en B. y el porcentaje de células con ADN fragmentado ("Apoptosis") se cuantificó mediante citometría de flujo. En color rojo se muestran los porcentajes obtenidos ± SD. Los gráficos muestran la media ± SD de tres experimentos independientes. *p≤0,05 y **p≤0,01 respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Por otro lado, se han descrito diferentes análogos estructurales de la LXA₄ nativa, entre ellos la 15-epi-LXA₄. Algunas publicaciones sugerían que en determinadas condiciones experimentales este derivado parecía ser más potente que el compuesto original. Se determinó que en RAW 264.7, la 15-epi-LXA₄ no poseía el efecto protector frente a la apoptosis que observamos con la LXA₄ (Fig.2).

Asimismo, se ha descrito que la LXA₄ puede llevar a cabo su función mediante la interacción con un receptor de membrana específico conocido como ALX. Para comprobar si los efectos anti-apoptóticos observados en nuestro caso estaban mediados por esta vía, se utilizó Boc-2, un péptido sintético antagonista del receptor, de forma que en presencia de dicho compuesto la señalización a través de ALX quedaba bloqueada.

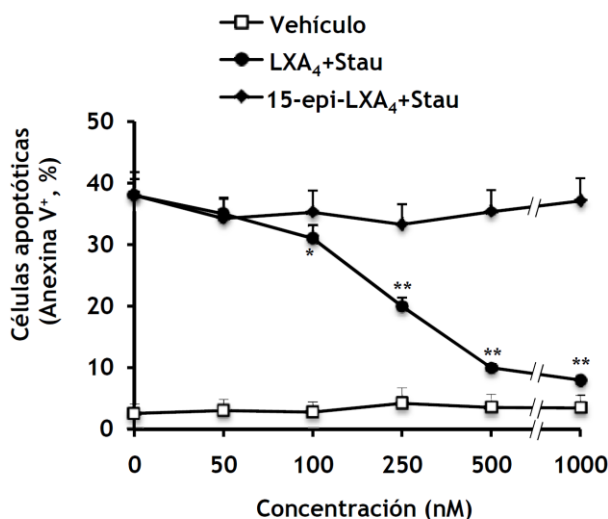


Fig.2. Efectos de la 15-epi-LXA₄ sobre la apoptosis inducida con Stau en RAW 264.7. Las células fueron tratadas con LXA₄, 15-epi-LXA₄ o su vehículo a las concentraciones indicadas de forma previa (2 h) a la inducción de apoptosis con Stau (200 ng/ml, 4 h). El porcentaje de células positivas para anexina V fue determinado por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Las células RAW 264.7 fueron tratadas con Boc-2 1 μ M durante 1 h antes de la adición de LXA₄. Seguidamente fueron expuestas a Stau como se indica en la figura (Fig.3). Se determinó que ni la LXA₄ ni el péptido Boc-2 por sí mismos ejercían un efecto tóxico en estas células, puesto que en su presencia se mantenían valores de apoptosis inferiores al 10% respecto a la población celular total. Mientras que el pre-tratamiento con LXA₄ inducía una reducción muy significativa de la apoptosis, la presencia adicional de Boc-2 inhibía parcialmente este efecto. Esto sugiere que los efectos de la LXA₄ en este modelo estarían mediados, al menos parcialmente, por la interacción con el receptor ALX.

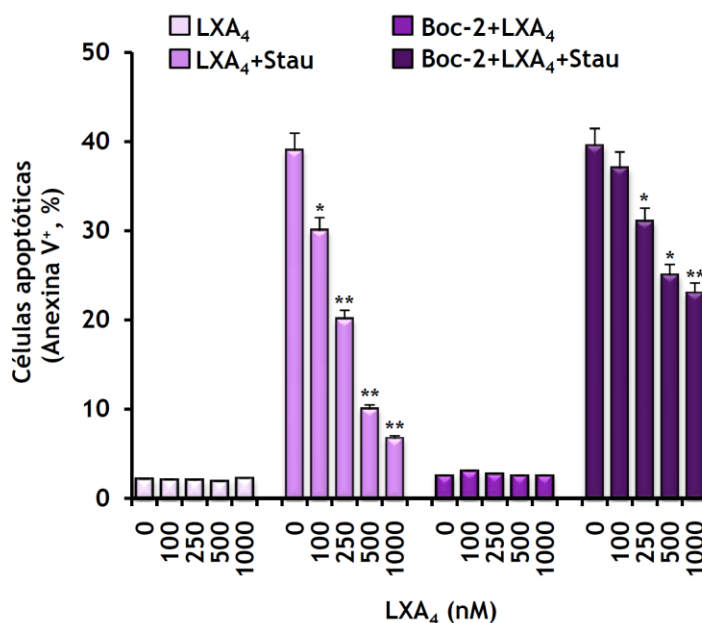


Fig.3. Implicación del receptor específico ALX en los efectos anti-apoptóticos de la LXA₄ en RAW 264.7. Las células fueron pre-tratadas con el péptido Boc-2 (1 μ M) 1 h antes de la adición de LXA₄ a diferentes concentraciones. Dos horas después, se indujo apoptosis celular con Stau (200 ng/ml, 4 h) en los casos indicados. El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado por citometría de flujo mediante marcaje con anexina V. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

1.2. Efectos del tratamiento con LXA₄ frente a la apoptosis inducida por otros compuestos.

Quisimos confirmar si la protección de la LXA₄ frente a la apoptosis en RAW 264.7 se mantenía en respuesta a otros agentes pro-apoptóticos. Los compuestos utilizados fueron etopósido (agente antitumoral que induce apoptosis por bloqueo del ciclo celular, inhibiendo la topoisomerasa II), GSNO (donador espontáneo de óxido nítrico) y LPS/IFN- γ (a concentraciones elevadas induce apoptosis en células de tipo macrófago).

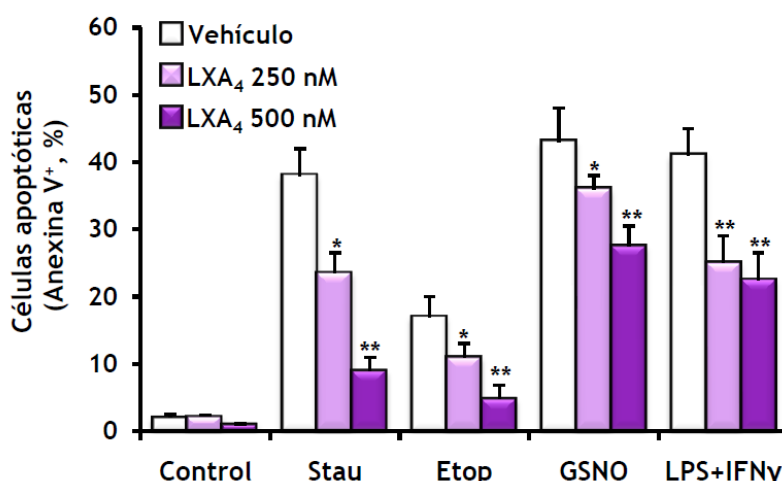


Fig.4. Papel de la LXA₄ frente a la apoptosis inducida por diferentes estímulos en RAW 264.7. Las células fueron pre-tratadas con LXA₄ o su vehículo a las concentraciones indicadas durante 2 h. A continuación se indujo apoptosis celular con Stau (200 ng/ml), etopósido (1 μ M), GSNO (0,5 mM) durante 18 h o LPS/IFN γ (500 ng/ml- 20 ng/ml) durante 48 h. El porcentaje de células apoptóticas (positivas para anexina V) se determinó por citometría de flujo. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄. Etop: etopósido.

Se determinó que el etopósido no inducía un elevado porcentaje de muerte celular en este sistema, alcanzando valores máximos cercanos al 20% (Fig.4). Aun así, la presencia de LXA₄ provocó una inhibición significativa de la apoptosis, siendo su efecto protector más potente a 500 nM. Tanto el GSNO como el LPS+IFN γ generaron una apoptosis incluso superior a la obtenida con el tratamiento con Stau, alcanzando valores superiores al 40%. El tratamiento con LXA₄ fue capaz de inhibir en todos los casos la apoptosis de forma significativa, demostrando así un efecto protector importante frente a diferentes tipos de estímulos pro-apoptóticos.

2. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS EN CÉLULAS RAW 264.7.

2.1. Determinación “*in vitro*” de los efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la activación de las caspasas.

La activación de las caspasas es un paso fundamental en la mayoría de los procesos apoptóticos. Puesto que nuestros resultados anteriores indicaban que la LXA₄ ejercía un efecto anti-apoptótico en células RAW 264.7, quisimos determinar si era capaz de inhibir directamente la activación de dichas proteasas. Como primera aproximación, se realizaron determinaciones “*in vitro*” de los efectos de la LXA₄ sobre la activación de dos caspasas iniciadoras (8 y 9) y una efectora (3), utilizando sustratos químicos que emiten fluorescencia al ser hidrolizados por dichas caspasas.

Se determinó que la Stau era capaz de activar de forma muy significativa todas las caspasas analizadas tanto a 4 como a 18 h (Fig.5). Las iniciadoras, como cabía esperar, se activaron más rápidamente, aumentando la actividad 2 y 3 veces para las caspasas 8 y 9 respectivamente en sólo 4 h. En cambio, la actividad de la caspasa 3 llegó a multiplicarse por cuatro tras 18 h de exposición a Stau. El pre-tratamiento con LXA₄ redujo la actividad de todas ellas prácticamente a niveles basales, apoyando así nuestros resultados previos.

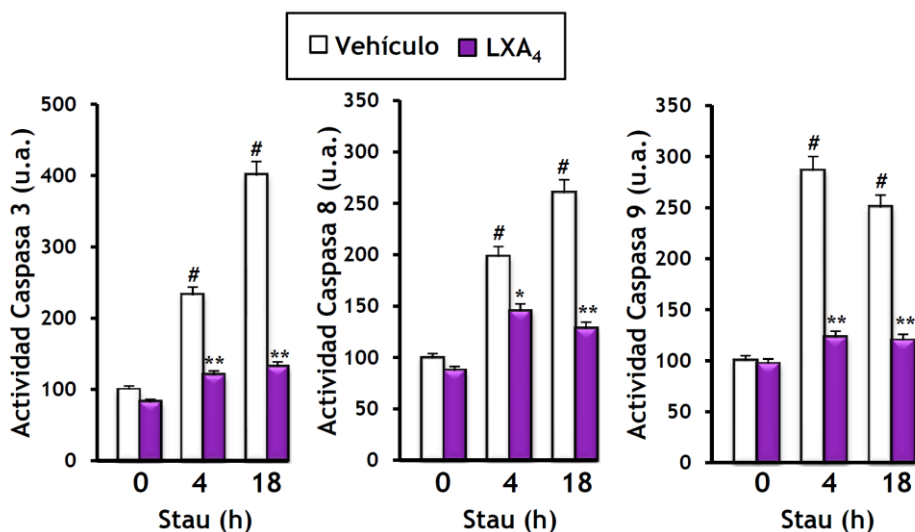


Fig.5. Determinación “*in vitro*” de los efectos de la LXA₄ sobre la activación de las caspasas 3, 8 y 9. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes) o su vehículo. La actividad de las caspasas 3, 8 y 9 fue determinada en extractos proteicos totales por fluorimetría. Los gráficos muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. [#] $p \leq 0,01$ respecto a la condición control; ^{*} $p \leq 0,05$; ^{**} $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

2.2. Determinación “*in vivo*” de los efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la activación de las caspasas.

Para corroborar si la LXA₄ era capaz de inhibir de forma eficaz la activación de las caspasas, se utilizó el kit comercial “CaspGlow®” (Biovision) que permite detectar actividad caspasa por fluorescencia en células vivas. El reactivo Z-VAD, un inhibidor comercial de las caspasas, fue utilizado como control (Fig.6).

Se analizó la activación de las tres caspasas detalladas en el apartado anterior tras 18 h de exposición a Stau y con pre-tratamientos de 2 h en los casos indicados con LXA₄ (250 nM) o con Z-VAD (1 μ l/ml). Todas las imágenes obtenidas fueron cuantificadas utilizando un soporte informático específico

(ejemplo representativo para la caspasa 3, Fig.6A). Se determinó que casi un 60% de las células tenían activadas las caspasas 8 y 9 tras el tratamiento con Stau, superando el 70% en el caso de la caspasa 3 (Fig.6B). El tratamiento con LXA₄ produjo una inhibición muy significativa de este efecto, en un rango comparable al generado por el control Z-VAD, alcanzando porcentajes de células activadas inferior al 40% en el caso de las caspasas 8 y 9 y de aproximadamente el 20% en el caso de la caspasa 3.

3. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ NO EJERCE EFECTOS NOTABLES SOBRE LA VÍA DE APOPTOSIS EXTRÍNSECA EN RAW 264.7.

Se ha descrito que la apoptosis celular puede estar mediada por receptores específicos conocidos como “receptores de muerte” entre los que destacan FAS y TNF- α . Se quiso comprobar si alguna de estas vías apoptóticas celulares se encontraba afectada en células RAW 264.7 por el tratamiento con LXA₄.

3.1. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la vía de FAS.

En primer lugar se analizó el efecto de la LXA₄ sobre la vía de FAS. Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial que reconoce y se une al receptor FAS (CD95) en células de ratón (en este caso el clon utilizado recibe el nombre de Jo2), desencadenando apoptosis.

Las células fueron estimuladas con el anticuerpo contra FAS (1 μ g/ml 48 h) tras un pre-tratamiento durante 2 h con dos concentraciones diferentes de LXA₄ como se indica en la figura 7 (Fig.7A). Finalizados los tiempos de exposición, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo.

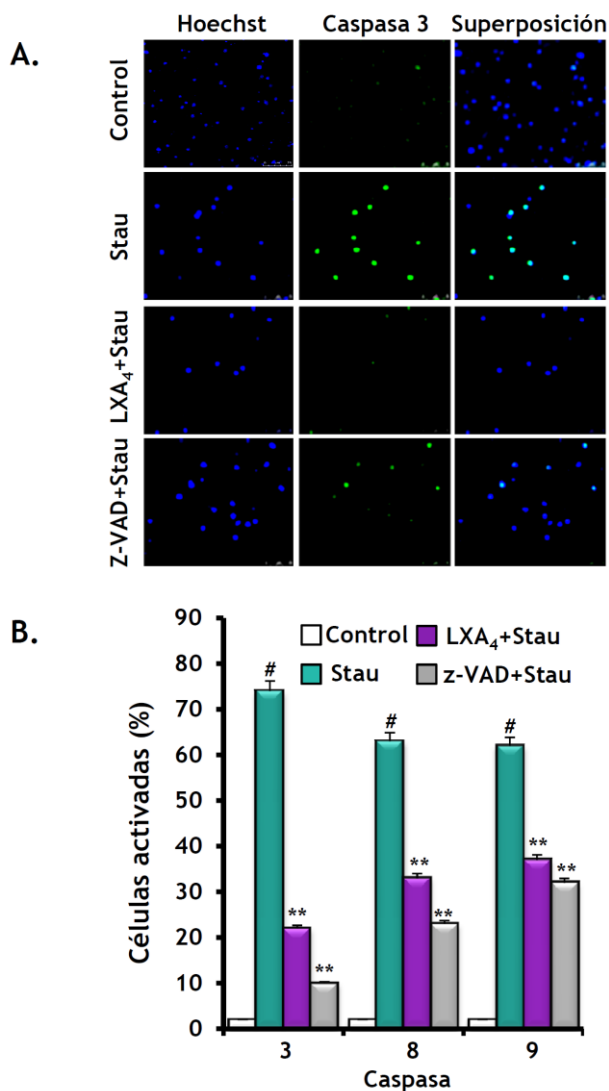


Fig.6. Medida “in vivo” de la regulación de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 por LXA₄. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) durante 18 h en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). El inhibidor de apoptosis z-VAD (20 μ M) fue utilizado como control. La activación de las caspasas 3, 8 y 9 fue analizada por microscopía confocal utilizando el kit comercial CaspGLOW®. **A.** Se muestra un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas en el caso de la caspasa 3. **B.** La intensidad de fluorescencia fue digitalizada y el porcentaje de células activadas fue cuantificado con respecto al número total de células por marcaje con Hoechst. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. [#] $p \leq 0,01$ respecto a la condición control; ^{**} $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Los resultados obtenidos indican que la activación de la vía de FAS producía un aumento modesto aunque significativo del porcentaje de células apoptóticas en RAW 264.7, alcanzándose valores máximos de muerte celular cercanos al 15%. El tratamiento con LXA₄ no tuvo efectos significativos sobre estos valores.

3.2. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la vía de TNF- α .

Para determinar si la LXA₄ tenía algún efecto sobre la apoptosis inducida a través de la vía de TNF- α , se realizó un pre-tratamiento con LXA₄ a las concentraciones indicadas y seguidamente las células fueron estimuladas con TNF- α 10 ng/ml durante 24 h. A continuación se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo (Fig.7B).

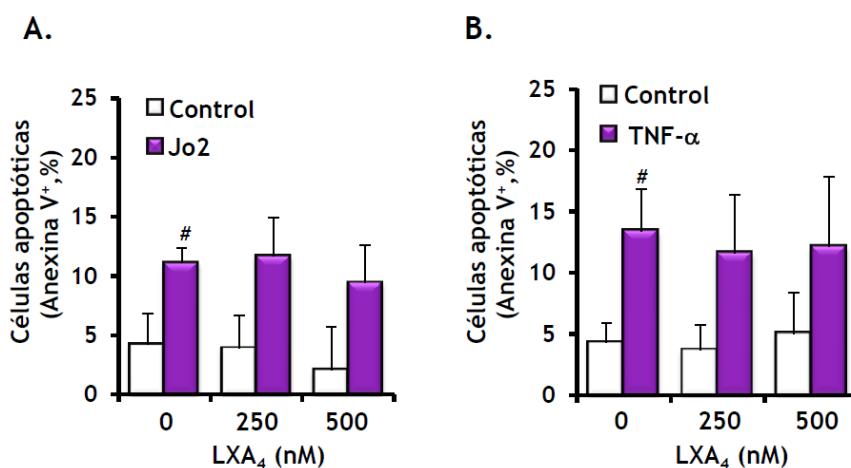


Fig.7. Efecto de la LXA₄ sobre la apoptosis mediada por la vía de los “receptores de muerte”, FAS y TNF- α . Las células fueron estimuladas con Jo2 (1 μ g/ml, 48 h) en A. o TNF- α (10 ng/ml, 24 h) en B. en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de LXA₄ (2 h antes). El porcentaje de células positivas para anexina V fue determinado por citometría de flujo. Los gráficos muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. #p \leq 0,05 respecto al control.

Se observó que el tratamiento de las células con TNF- α inducía, al igual que en el caso de FAS, un aumento moderado del porcentaje de células apoptóticas frente a la población total, alcanzando valores de aproximadamente el 15%. En este caso la LXA₄ tampoco presentaba efectos significativos.

Los resultados obtenidos en estos ensayos indican que la LXA₄ no estaría ejerciendo sus principales efectos a través de las vías apoptóticas mediadas por “receptores de muerte”.

4. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ INHIBE LA APOPTOSIS A TRAVÉS DE LA VÍA MITOCONDRIAL.

Otra vía apoptótica ampliamente descrita está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, que ejercen su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de esta familia promueve la formación de un poro en la membrana mitocondrial que permite la liberación al citosol de proteínas apoptóticas como citocromo c o AIF. De esta forma se genera un complejo proteico citosólico conocido como “apoptosoma” que activa directamente a las caspasas produciendo apoptosis.

4.1. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2.

Para determinar si la LXA₄ ejercía algún efecto sobre los niveles de expresión de algunas de las principales proteínas apoptóticas de la familia Bcl-2, se realizó un pre-tratamiento de las células con LXA₄, que a continuación fueron estimuladas con Stau a los tiempos indicados en la figura (Fig.8A). Los niveles proteicos fueron cuantificados mediante “Western blot”.

Comparando los resultados obtenidos en presencia y ausencia de LXA₄, se determinó que el pre-tratamiento con este compuesto no inducía cambios significativos en los niveles de proteínas pro-apoptóticas como Bax. Por el contrario sí generaba un aumento en los niveles de expresión de las proteínas

anti-apoptóticas, como Bcl-2, Mcl-1 o x-IAP, manteniendo niveles mayores incluso tras 16 h de tratamiento.

Se cuantificaron las diferencias de expresión realizando ratios entre las proteínas anti y pro-apoptóticas (Fig.8B), siendo más elevada la presencia de proteínas anti-apoptóticas en las células que recibieron el pre-tratamiento con LX_{A4}.

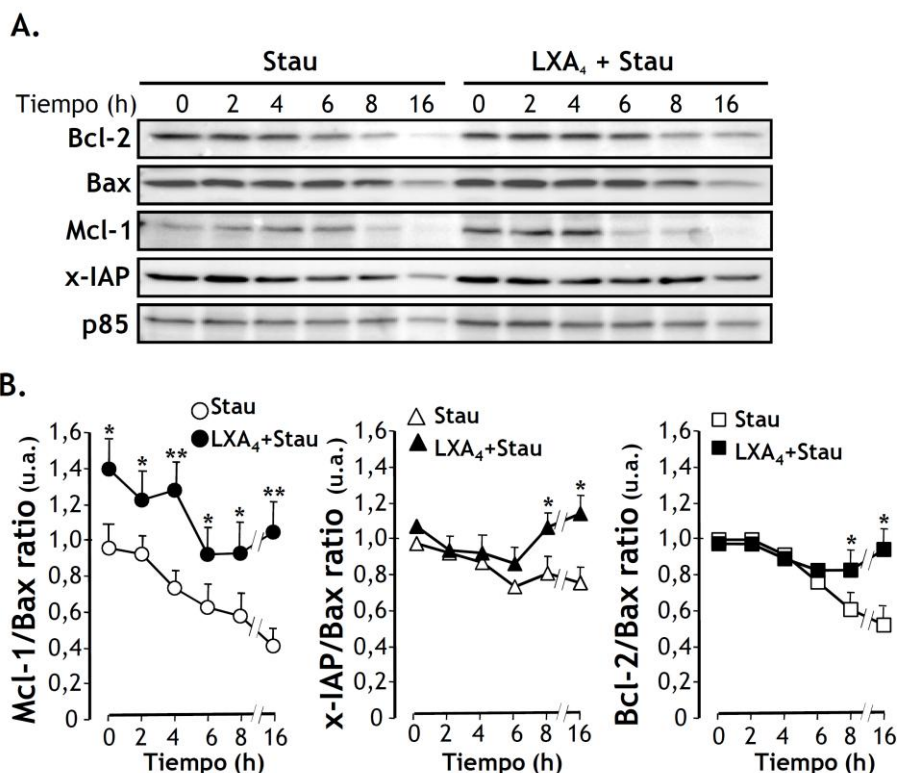


Fig.8. Modulación mediada por la LX_{A4} de los niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2. Las células RAW 264.7 fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de LX_{A4} (250 nM, 2 h antes). Los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2, Bax, Mcl-1, X-IAP y p85 (como control de carga) fueron detectados mediante “Western blot” en extractos proteicos totales. **A.** Se muestra un gel representativo de tres experimentos diferentes. **B.** Los ratios entre las proteínas anti y pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 fueron calculados a diferentes tiempos. Los gráficos muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LX_{A4}.

Para corroborar estos efectos a nivel de transcripción, las células RAW 264.7 fueron estimuladas durante 4 h sólo con LXA₄ o con Stau durante 4 h en presencia o ausencia del pre-tratamiento de 2 h con LXA₄. Los posibles cambios de expresión génica fueron analizados mediante *qPCR* (Fig.9).

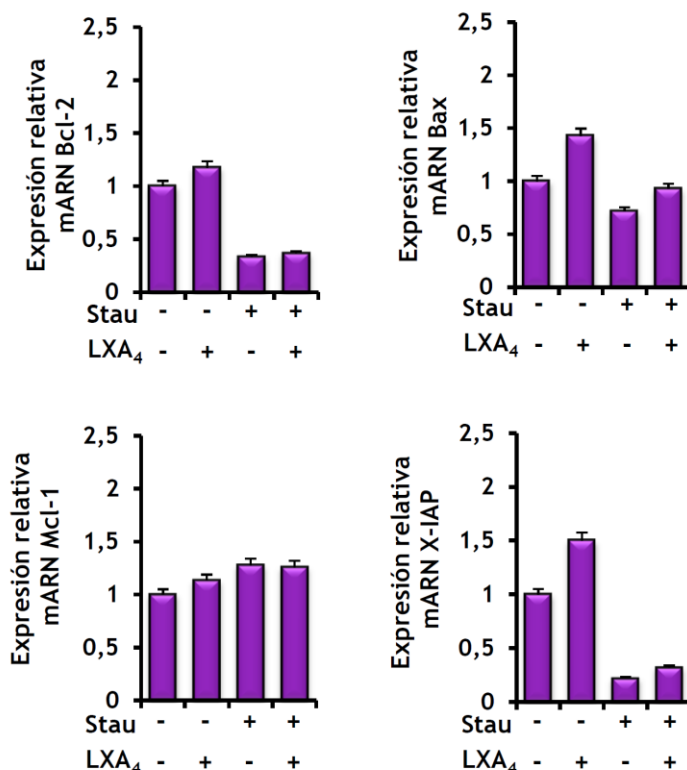


Fig.9. Efecto de la LXA₄ sobre la expresión relativa de las proteínas de la familia Bcl-2 a nivel de mARN. Las células fueron tratadas sólo con LXA₄ (250 nM, 2 h) o con Stau (200 ng/ml, 2 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). Los niveles de expresión a nivel de mARN de las proteínas Bcl-2, Bax, Mcl-1 y X-IAP fueron cuantificados mediante *qPCR*, utilizando 36B4 como gen de referencia. Se calcularon los valores de expresión relativa mediante el método del $\Delta\Delta Ct$. Los resultados muestran la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados a su vez por duplicado. No se consideraron como significativos cambios de expresión relativa inferiores a 2.

Los resultados obtenidos confirmaron nuestros datos previos y concluyeron que el tratamiento con LXA₄, al menos a los tiempos analizados, no inducía cambios significativos en los niveles de expresión génica de las proteínas de la familia Bcl-2 analizadas en RAW 264.7.

4.2. Efecto del tratamiento con LXA₄ sobre el citocromo c mitocondrial.

Uno de los eventos fundamentales en la vía apoptótica mitocondrial es la liberación de proteínas mitocondriales al citoplasma, como citocromo c.

Para determinar si el tratamiento con LXA₄ estaba afectando a este hecho, las células fueron pre-tratadas con dicho lípido y seguidamente expuestas durante diferentes periodos de tiempo a Stau (Fig.10). Los niveles proteicos fueron cuantificados mediante “Western blot”. Se muestra un gel representativo en la Fig.10A.

Nuestros resultados indicaron que en las células tratadas únicamente con Stau se producía una salida del citocromo c desde la mitocondria al citosol a partir de las 4 h de tratamiento, disminuyendo de forma concordante sus niveles proteicos en la mitocondria (Fig.10B). En cambio, en los extractos correspondientes a las células pre-tratadas con LXA₄, el citocromo c quedaba retenido en gran medida en la mitocondria, produciéndose la salida del mismo al citosol tras 4-6 h de tratamiento.

4.3. Efecto del tratamiento con LXA₄ sobre la liberación de AIF.

Otra de las proteínas mitocondriales que es liberada al citosol durante la apoptosis es AIF. Se determinó si el tratamiento con LXA₄ también estaba afectando a su salida de la mitocondria.

Las células fueron tratadas de la misma forma que en el apartado anterior y se analizó la localización subcelular proteica de AIF por inmunofluorescencia. Se cuantificó en las imágenes la cantidad de esta proteína que permanecía retenida en la mitocondria analizando su colocalización con el marcador

mitocondrial (Mitotracker) (Fig.11). Se muestra un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas en la Fig.11A. Nuestros resultados concluyeron que en células control la mayor parte de AIF permanecía en la mitocondria, obteniendo un coeficiente de colocalización medio de 0,7 (Fig.11B). Cuando las células eran tratadas con Stau, la colocalización se reducía, bajando el coeficiente específico hasta valores medios de 0,05. El pre-tratamiento de las células con LXA₄ fue capaz de recuperar dicho coeficiente hasta valores medios de 0,33, inhibiendo la salida al citoplasma de esta proteína desde mitocondria.

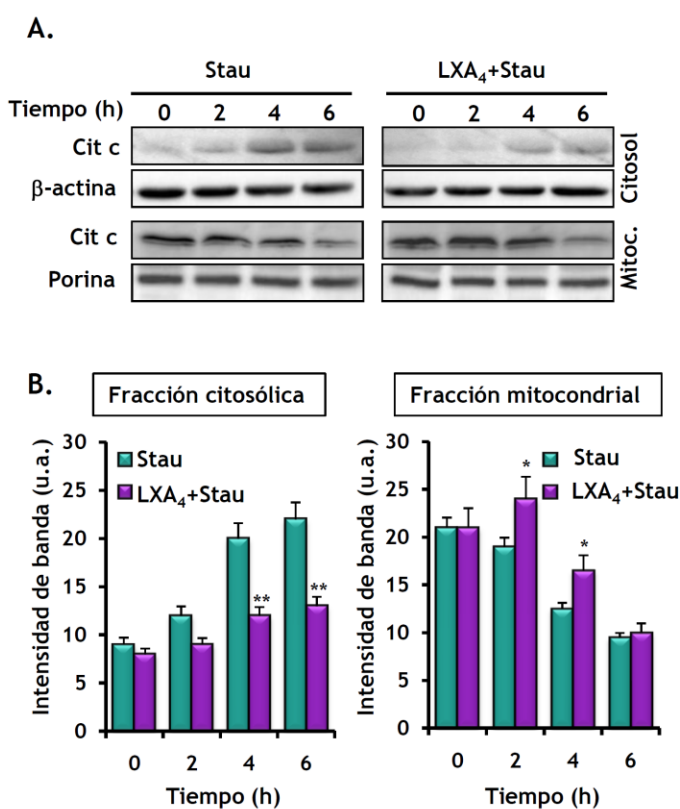


Fig.10. Regulación de la salida de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma en RAW 264.7. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). Los niveles proteicos de citocromo c fueron analizados tanto en extractos mitocondriales como citosólicos mediante “Western blot”, mostrando en A. un gel representativo. B. Los niveles de expresión se cuantificaron y normalizaron utilizando la β-actina o la porina como controles de carga citosólico y mitocondrial respectivamente. Los gráficos representan la media ± SD de tres experimentos independientes. *p≤0,05; **p≤0,01 respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Estos resultados indicaban que la LXA₄ presentaba efectos protectores muy significativos frente a la apoptosis mitocondrial, manteniendo mayores niveles de las proteínas anti-apoptóticas e inhibiendo a su vez la salida al citosol de mediadores mitocondriales.

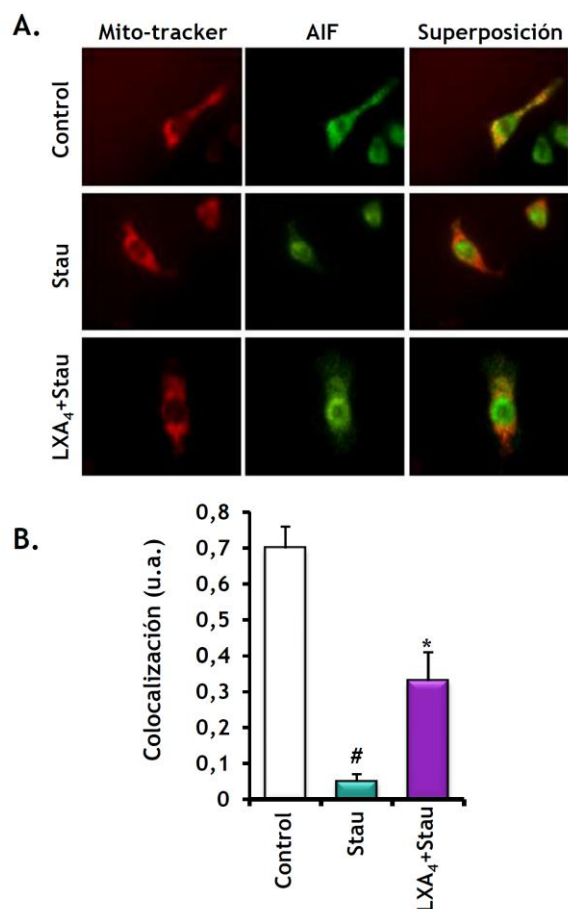


Fig.11. Inhibición de la salida de AIF al citoplasma celular en RAW 264.7 mediada por LXA₄. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes) y la distribución subcelular de AIF se determinó por inmunofluorescencia. Se muestra una imagen representativa en **A**. Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas para determinar la colocalización del marcador mitocondrial (en color rojo) y AIF (en color verde) generándose píxeles de color amarillo. **B**. El coeficiente específico de co-localización se determinó utilizando el programa Image J. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. [#] $p \leq 0,01$ respecto al control; ^{*} $p \leq 0,05$ respecto al correspondiente valor sólo con Stau.

5. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ REDUCE EL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR.

Otro de los factores implicados en los procesos apoptóticos es el estrés oxidativo, que conlleva un aumento de la presencia de especies reactivas generalmente derivadas del oxígeno que son altamente agresivas en las células.

Las células RAW 264.7 fueron tratadas con Stau durante 4 o 18 h, después del pre-tratamiento con LXA₄ durante 2 h a las concentraciones indicadas (Fig.12). El grado de estrés oxidativo al que estaban sometidas las células fue determinado por citometría de flujo mediante la utilización de las sondas DCFH (Fig.12A) y DAF-2 (Fig.12B).

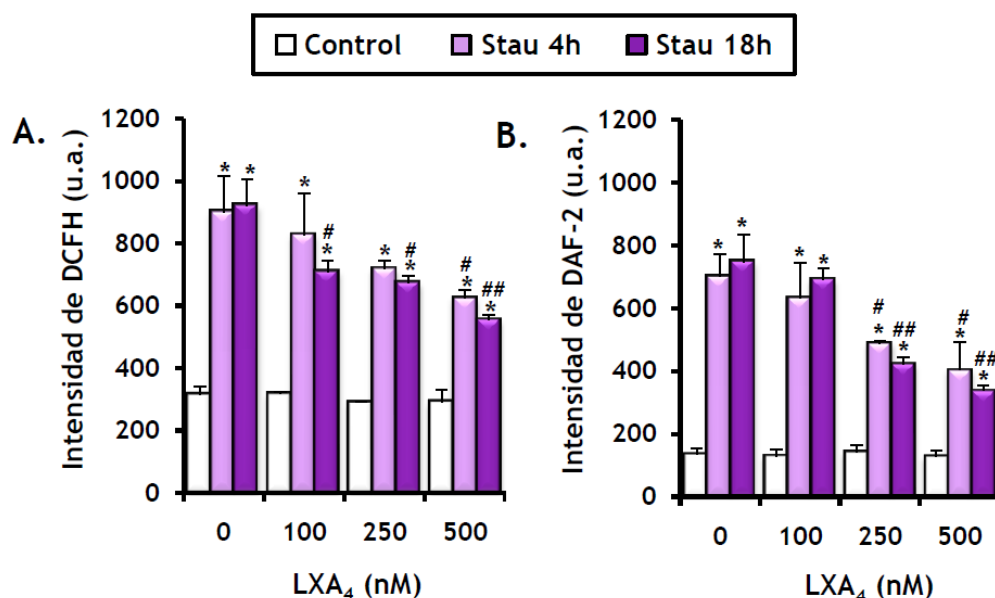


Fig.12. Reducción del estrés oxidativo celular mediado por LXA₄. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con LXA₄ durante 2 h a diferentes concentraciones. El aumento del estrés oxidativo celular fue cuantificado por citometría de flujo mediante la oxidación de las sondas DCFH (A) o DAF-2 (B). Los gráficos muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. *p<0,01 respecto al control; #p<0,05; ##p<0,01 respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Los resultados obtenidos mostraban que en células tratadas con Stau se generaban cantidades muy significativas de agentes oxidantes detectables a partir de las 4 h de exposición, tanto de peróxido de hidrógeno (DCFH) como de NO (DAF-2), que se mantenían tras 18 h de tratamiento. El pre-tratamiento de las células con concentraciones de LXA₄ superiores a 250 nM reducía esta producción de forma significativa en ambos casos.

Así, la LXA₄ estaría disminuyendo el enorme estrés oxidativo generado en las células tras el tratamiento con Stau, protegiéndolas de este modo frente a la apoptosis.

6. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ INDUCE LA ACTIVACIÓN DE ERK.

Las MAPKs son proteínas quinasas que regulan funciones celulares muy diversas. Debido a la importancia de esta familia en procesos de supervivencia y/o muerte celular, nos interesamos en saber si la LXA₄ estaba afectando a su activación. En particular, quisimos analizar si producía algún efecto notable sobre ERK, proteína muy implicada en supervivencia celular o sobre las vías de JNK y p38, que son activadas en respuesta a estrés celular y generalmente pro-apoptóticas.

Tras un pre-tratamiento de las células con LXA₄, éstas fueron estimuladas con Stau a los tiempos indicados (Fig.13A). Los niveles de fosforilación de las proteínas mencionadas fueron cuantificados por “Western blot”.

Se comprobó que el tratamiento con Stau estaba induciendo la fosforilación y consecuente activación de JNK y p38 a partir de los 30 min de exposición al compuesto, sin afectar a la vía de ERK. En contraposición, se observó que las células que recibieron el pre-tratamiento con LXA₄ tenían aumentada la activación de ERK a partir de los 30 min, sin presentar ninguna diferencia significativa en p38 y JNK. Para cuantificar dichos efectos, se realizó un ratio comparativo entre la cantidad de ERK fosforilada y la total en cada uno de los casos analizados (Fig.13B). Se observó que en las células que recibieron el

tratamiento con LXA₄ la activación de esta vía de supervivencia era superior a todos los tiempos analizados.

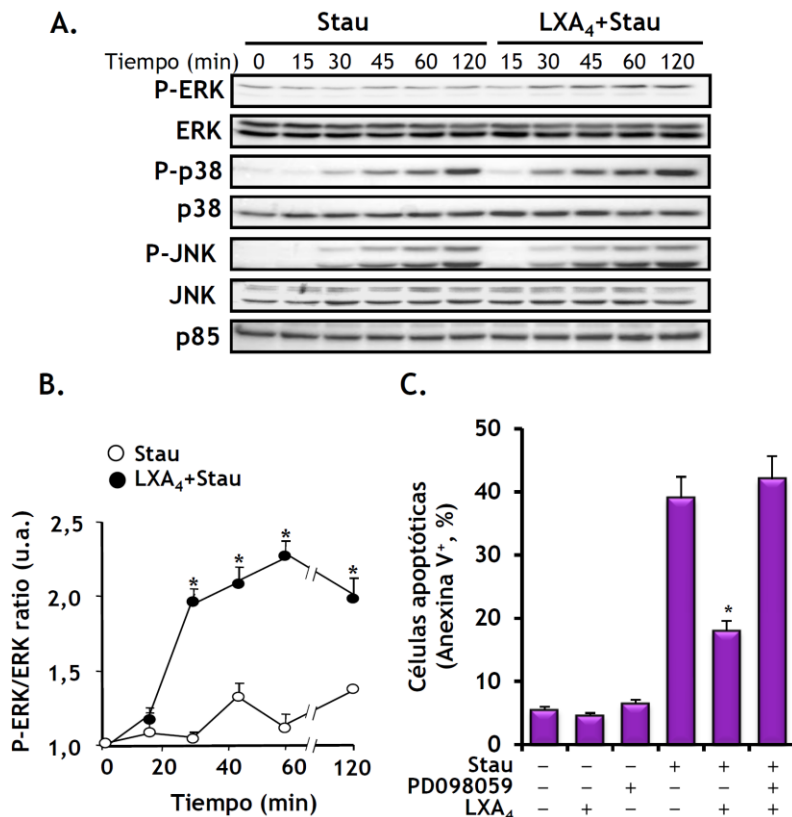


Fig.13. Implicación de la vía de las MAPKs en los efectos protectores de la LXA₄. Activación de ERK. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con LXA₄ (250 nM, 2 h). Los niveles de expresión y fosforilación de ERK, p38 y JNK fueron analizados en extractos proteicos totales mediante “Western blot”, utilizando p85 como control de carga. **A.** Se muestra un gel representativo de tres experimentos diferentes. **B.** El ratio entre la cantidad de proteína ERK fosforilada y total fue calculado a todos los tiempos analizados. **C.** Se realizó un tratamiento de las células con el inhibidor de ERK (PD098059, 1μM 30 min) de forma previa a la adición de LXA₄ (250 nM) durante 2 h. Seguidamente se añadió la Stau (200 ng/ml, 18 h) y se cuantificó el porcentaje de células positivas para anexina V por citometría de flujo. Los gráficos que se muestran representan la media ± SD de tres experimentos independientes. *p≤0,01 respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Para corroborar la implicación de ERK en los efectos observados tras los estímulos con LXA₄, las células fueron tratadas con un inhibidor farmacológico específico de la activación de esta vía, PD098059 a una concentración de 1 μ M durante 30 min de forma previa al tratamiento con LXA₄. Seguidamente se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas utilizando marcaje con anexina V (Fig.13C). Se determinó que el potente efecto inhibidor de la apoptosis producido en presencia de LXA₄, desaparecía en las células que habían recibido el tratamiento con el inhibidor de ERK. Estos resultados indican que la vía de activación de ERK juega un papel fundamental en los efectos anti-apoptóticos observados tras el tratamiento con LXA₄.

7. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ PRODUCE UNA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE PI3K/Akt.

Otra de las vías básicas de supervivencia en las células es la mediada por PI3K/Akt. Quisimos determinar si el tratamiento de nuestras células con LXA₄ estaba afectando a esta vía de señalización.

Puesto que la fosforilación y consecuente activación de Akt se produce a tiempos muy cortos (menores a 10 min) las células fueron tratadas con LXA₄ en ese rango de tiempo y los niveles de expresión y fosforilación de Akt fueron determinados mediante “Western blot”. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento con LXA₄ inducía una significativa fosforilación de Akt en su residuo de Ser473 a partir de los 2 min de estimulación, siendo máxima a los 5 min (Fig.14A).

Para corroborar la implicación de la vía de Akt en los efectos protectores frente a la apoptosis observados tras el tratamiento con LXA₄, las células fueron expuestas a un inhibidor farmacológico de la PI3K (LY294002 a 1 μ M, 30 min) de forma previa al tratamiento con este compuesto. Seguidamente fueron incubadas con anexina V y se cuantificó el número de células positivas por citometría de flujo (Fig.14B). Los resultados obtenidos concluyeron que los

efectos anti-apoptóticos inducidos por LXA₄ disminuían significativamente en presencia de LY294002, indicando una implicación de la vía de la PI3K en los efectos observados.

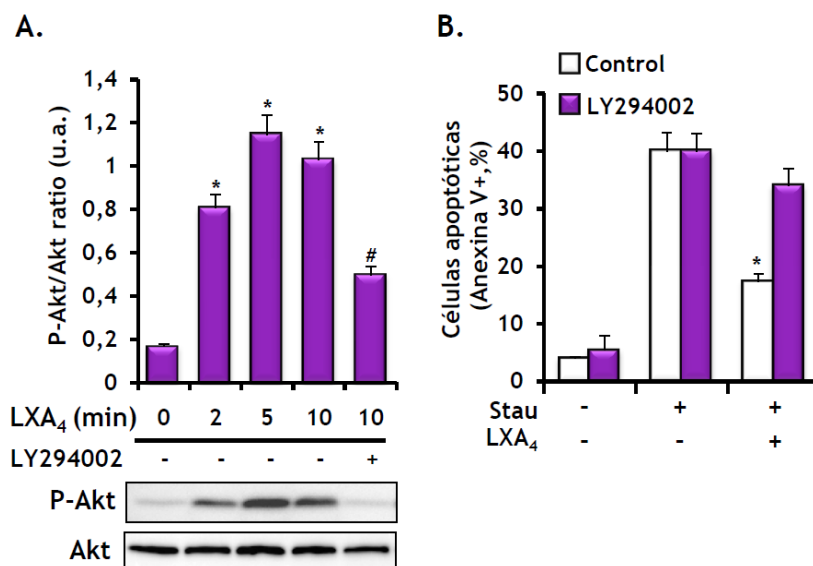


Fig.14. Activación de la vía de supervivencia de Akt mediada por LXA₄. A. Las células fueron tratadas con LXA₄ (250 nM) durante 2, 5 y 10 min en presencia o ausencia del inhibidor LY294002 (10 μ M, 30 min). Los niveles de expresión y el grado de fosforilación de Akt en su residuo de Ser473 fueron analizados mediante “Western blot”, mostrándose un ejemplo representativo en la parte inferior de la figura. El ratio entre la proteína fosforilada y la total fue cuantificado a partir de tres experimentos diferentes. B. Se realizó un tratamiento de las células con el inhibidor de PI3K (LY294002, 10 μ M 30 min) de forma previa a la adición de LXA₄ (250 nM) durante 2 h en los casos indicados. Seguidamente se añadió la Stau (200 ng/ml, 18 h) y se cuantificó el porcentaje de células positivas para anexina V por citometría de flujo. Los gráficos muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,01$ respecto al valor en ausencia de LXA₄. # $p \leq 0,01$ respecto al valor correspondiente en ausencia de LY294002.

8. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ INDUCE LA ACTIVACIÓN DE Nrf-2.

8.1. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre los niveles proteicos de Nrf-2 en el núcleo celular.

El factor de transcripción Nrf-2 regula la respuesta anti-oxidante de las células. Puesto que nuestros resultados previos demostraban que la LXA₄ reducía la producción de especies reactivas oxidantes en nuestro modelo y que además estaba descrito que la vía de Nrf-2 puede ser activada por ERK, se decidió analizar si en nuestro sistema de estudio, la LXA₄ estaba induciendo la activación de este factor de transcripción.

Las células fueron pre-tratadas en los casos correspondientes con LXA₄ y seguidamente estimuladas con Stau a los tiempos indicados. Los niveles proteicos de Nrf-2 en el núcleo fueron determinados por “Western blot” (se muestra un gel representativo en la Fig.15A) y cuantificados (Fig.15B). Los resultados obtenidos ponían de manifiesto que la Stau inducía una leve respuesta de activación de la vía Nrf-2 puesto que se detectaron niveles significativos de la proteína en el núcleo a partir de los 30 min de exposición. En las células pre-tratadas con LXA₄, la activación de la vía se encontraba aumentada significativamente y la cantidad de Nrf-2 detectada en el núcleo fue mucho más elevada en estas células a todos los tiempos analizados, siendo máxima a los 60 min.

8.2. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la actividad de Nrf-2.

Quisimos analizar también si la LXA₄, además de inducir la translocación de Nrf-2 al núcleo celular, era capaz de regular su función como factor de transcripción.

Para ello, se realizaron unos experimentos de transfección transitoria de las células utilizando el plásmido ARE-Luc, que contiene tres secuencias ARE en tándem unidas a un gen reportero de la luciferasa y clonadas en un vector

pGL3basic que a su vez fue utilizado como control. Posteriormente las células fueron expuestas a diversos estímulos. Se utilizó MG132 (20 μ M durante 6 h) como control positivo de la activación, puesto que es un inhibidor del proteasoma celular que impide la degradación e incrementa la estabilidad de Nrf-2, potenciando así su actividad. Por otro lado, se realizaron estímulos con LXA₄ durante 6 h, en presencia o ausencia del inhibidor de ERK (PD098059 1 μ M, 30 min) para determinar la posible existencia de un efecto directo sobre la activación de la vía y finalmente, con Stau durante 6 h en presencia o ausencia del pre-tratamiento con LXA₄. La actividad luciferasa presente en cada una de las muestras fue cuantificada en el luminómetro (Fig.16A).

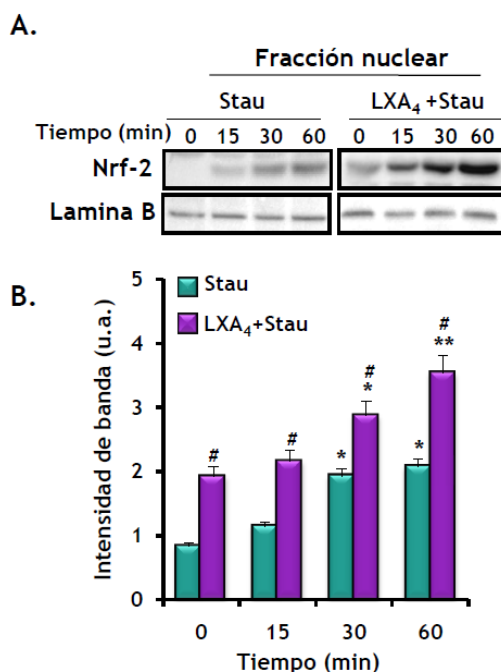


Fig.15. Regulación de la translocación al núcleo de Nrf-2 por el tratamiento con LXA₄. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h). Los niveles proteicos de Nrf-2 fueron analizados en extractos nucleares de RAW 264.7, utilizando como control de carga la proteína Lamina B. **A.** Se muestra un gel representativo de tres experimentos diferentes. **B.** Las diferencias de expresión proteica fueron cuantificadas a los diferentes tiempos analizados. El gráfico que se muestra representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente control sin Stau; # $p \leq 0,01$ respecto al valor correspondiente en ausencia de LXA₄.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con LXA₄ induce un aumento significativo de la actividad luciferasa y por tanto de la activación de Nrf-2. Por el contrario, este efecto no se detectó ni en las muestras tratadas únicamente con Stau ni en las pre-tratadas con LXA₄. El inhibidor de ERK produjo una disminución significativa de la actividad luciferasa respecto a las muestras tratadas con LXA₄, indicando, de acuerdo con nuestros resultados anteriores, que la vía de ERK ejerce un papel fundamental en los efectos mediados por este compuesto.

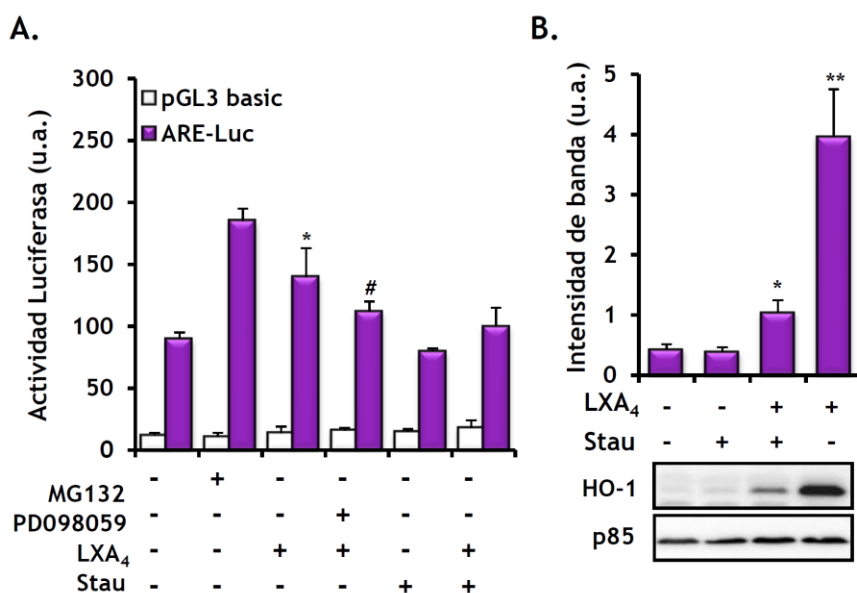


Fig. 16. Modulación de la activación de la vía de Nrf-2 mediada por la acción de la LXA₄. A. Las células RAW 264.7 fueron transfectadas con los vectores ARE-Luc o pGL3basic como control. A continuación fueron tratadas con PD098059 (1 μ M, 30 min) en los casos indicados y estimuladas con LXA₄ (250 nM, 6 h) o con Stau (200 ng/ml 6 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). MG132 (20 μ M, 6 h) fue utilizado como control positivo. La actividad luciferasa fue cuantificada por luminometría. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ respecto al control sin LXA₄; # $p \leq 0,05$ respecto al valor correspondiente en ausencia de PD098059. B. Las células fueron tratadas sólo con LXA₄ (250 nM, 2 h) o con Stau (200 ng/ml, 24 h) en presencia o ausencia del pre-tratamiento con LXA₄ (250 nM, 2 h). La expresión de HO-1 fue analizada por "Western blot" en extractos proteicos totales (se muestra un gel representativo en la parte inferior) y cuantificada utilizando p85 como control de carga. El gráfico muestra la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al control.

A continuación se abordó otra aproximación con el fin de cuantificar cambios en la actividad de Nrf-2 mediante el análisis de la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción, como la HO-1, en presencia de LXA₄.

Las células fueron tratadas sólo con LXA₄ durante 24 h o con Stau durante 24 h en presencia o ausencia del pre-tratamiento con LXA₄ 2 h, como se indica en la figura 16 (Fig.16B). Una vez finalizados estos tratamientos, se analizó la expresión de HO-1 en extractos proteicos totales mediante “Western blot” (se muestra un gel representativo en la Fig.16B).

Nuestros resultados concluyeron que las células sin tratar no expresaban esta proteína, así como las células que fueron tratadas únicamente con Stau. Por el contrario, la LXA₄ por sí misma fue capaz de aumentar cuatro veces la expresión de la proteína analizada. Sin embargo, cuando la LXA₄ fue suministrada como un pre-tratamiento seguido del estímulo con Stau el aumento de expresión observado fue significativamente menor. Esto corroboraría nuestros datos anteriores indicando una acción de la LXA₄ sobre el eje anti-oxidante Nrf-2, ya que este compuesto estaría induciendo su translocación al núcleo y su actividad.

8.3. Efectos del tratamiento con LXA₄ en macrófagos peritoneales de ratones Nrf-2^{-/-}.

Para confirmar si el efecto de la LXA₄ estaba mediado por Nrf-2 se realizaron experimentos utilizando ratones deficientes en dicho factor de transcripción (Nrf-2^{-/-}).

Se obtuvieron macrófagos peritoneales de animales Nrf-2^{+/+} y Nrf-2^{-/-} y dichas células se estimularon sólo con LXA₄ durante 18 h o con Stau durante 18 h en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con LXA₄, tal y como se indica en la figura 17 (Fig.17). Seguidamente los porcentajes de células apoptóticas fueron determinados por citometría de flujo.

Se comprobó que tanto en macrófagos peritoneales de animales Nrf-2^{+/+} como de Nrf-2^{-/-}, la apoptosis de los grupos de células no tratadas o tratadas únicamente con LXA₄ se mantuvo en niveles basales, alcanzando valores de aproximadamente el 5% de células apoptóticas frente al total. La respuesta de ambos frente al tratamiento con Stau fue muy similar, aumentando la apoptosis hasta valores aproximados del 40%. En cambio, en los animales Nrf-2^{+/+} el pre-tratamiento con LXA₄ redujo el porcentaje de células apoptóticas hasta valores inferiores al 30%, manteniendo el efecto protector observado previamente. Por el contrario, en los animales Nrf-2^{-/-}, la LXA₄ fue incapaz de inhibir la apoptosis celular.

Todos estos resultados concluyen que la LXA₄ estaría activando la vía protectora anti-oxidante ERK/Nrf-2.

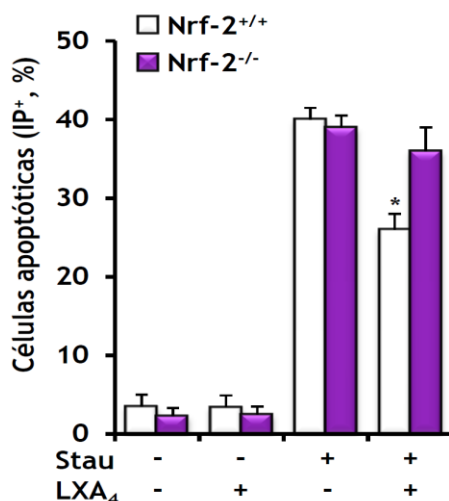


Fig.17. Efecto de la LXA₄ en macrófagos peritoneales de ratones Nrf-2^{-/-}. Macrófagos peritoneales de ratones Nrf-2^{+/+} y Nrf-2^{-/-} fueron tratados con LXA₄ (250 nM, 2 h) o con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con LXA₄ (250 nM, 2 h). El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado por citometría de flujo mediante marcaje con IP. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. *p \leq 0,01 respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

9. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ POSEE UN EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

Quisimos corroborar si los efectos anti-apoptóticos de la LXA₄ observados en RAW 264.7 se mantenían en cultivos primarios de macrófagos peritoneales murinos.

9.1. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la apoptosis inducida por Stau en macrófagos peritoneales.

Se analizó en primer lugar si la LXA₄ mantenía sus efectos protectores frente a la apoptosis inducida por Stau en macrófagos peritoneales murinos. Las células se estimularon de forma similar a los experimentos llevados a cabo en RAW 264.7, realizando un pre-tratamiento de las células correspondientes con LXA₄, seguido de la exposición a Stau durante 16 h. A continuación se cuantificó el porcentaje de células en apoptosis temprana (Fig.18A).

Se determinó que tanto las células control como las que únicamente habían sido tratadas con LXA₄ mantenían niveles de apoptosis celular inferiores al 10%. En presencia de Stau, el porcentaje de células apoptóticas aumentó significativamente hasta alcanzar niveles de aproximadamente un 40%. Por el contrario, el pre-tratamiento con LXA₄ indujo una reducción de dichos valores hasta alcanzar porcentajes del 30%. Estos resultados apuntaban a que la LXA₄ mantenía su efecto anti-apoptótico en macrófagos peritoneales murinos.

A continuación quisimos analizar si el efecto de la LXA₄ en estas células también se encontraba mediado por el receptor ALX. Para ello las células fueron tratadas con Boc-2 (1 μ M) 1 h antes del tratamiento con LXA₄, bloqueando así la activación del receptor. En el resto de los tratamientos se mantuvieron las mismas condiciones que en la Fig.18A. El porcentaje de células apoptóticas fue evaluado por citometría de flujo (Fig.18B).

Se comprobó que, al igual que en RAW 264.7, el efecto de la LXA₄ en estas células estaba mediado en parte por el receptor ALX, puesto que el pre-

tratamiento con el antagonista del mismo inhibió parcial pero significativamente la acción de la LXA₄.

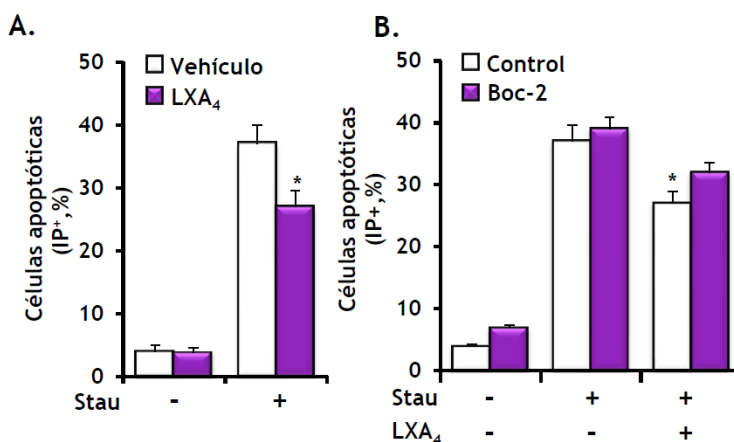


Fig.18. Modulación de la apoptosis inducida con Stau tras el tratamiento con LXA₄ en macrófagos peritoneales murinos. Efectos mediados por ALX. **A.** Los macrófagos peritoneales fueron tratados con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado mediante marcaje con IP por citometría de flujo. **B.** Los macrófagos fueron tratados como en **A.** en presencia o ausencia del péptido Boc-2 (1 μM) 1 h antes del tratamiento con LXA₄. De la misma manera se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas. Los gráficos muestran la media ± SD de tres experimentos independientes. *p≤0,05 respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

9.2. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la apoptosis inducida por diferentes estímulos pro-apoptóticos.

Por otro lado, quisimos corroborar si en estos macrófagos peritoneales murinos la LXA₄ era capaz de mantener su efecto protector frente a otros estímulos pro-apoptóticos, como LPS/IFN-γ o estimulando la vía de FAS. Se mantuvieron las mismas concentraciones y tiempos que los utilizados previamente para poder realizar un análisis comparativo (Fig.19). Se observó que en este tipo celular el estímulo con LPS/IFN-γ originaba un porcentaje de células apoptóticas de aproximadamente un 50% respecto a la población celular

total. En las células pre-tratadas con LXA₄ se mantuvo la protección, disminuyendo el porcentaje de células apoptóticas prácticamente a la mitad. En el caso de FAS, éste indujo una apoptosis celular de aproximadamente el 20% de la población total, efecto que se redujo de forma significativa en las células pre-tratadas con LXA₄ ($\approx 10\%$).

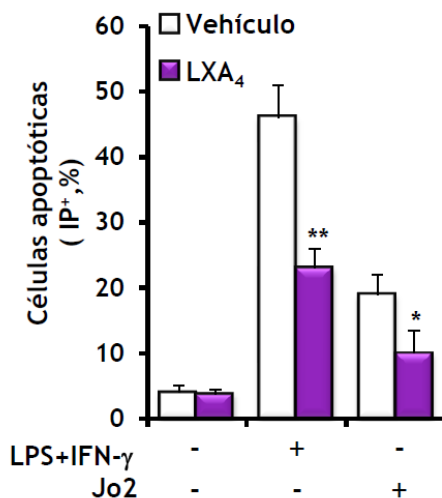


Fig. 19. Efecto protector de la LXA₄ frente a distintos estímulos pro-apoptóticos en macrófagos peritoneales murinos. Los macrófagos fueron tratados con LPS-IFN γ (500 ng/ml - 20 ng/ml) durante 48 h o con Jo2 (1 μ g/ml) durante 24 h en presencia del pre-tratamiento con LXA₄ (250 nM, 2 h) o su vehículo. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por citometría de flujo mediante marcaje con IP. El gráfico mostrado representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en presencia del vehículo.

9.3. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la activación de ERK.

A continuación quisimos analizar si el tratamiento con LXA₄ era capaz de activar la vía de ERK en macrófagos peritoneales.

Las células fueron tratadas como se indica en la figura y los niveles proteicos así como el grado de fosforilación de ERK fueron evaluados mediante “Western blot” (Fig.20A).

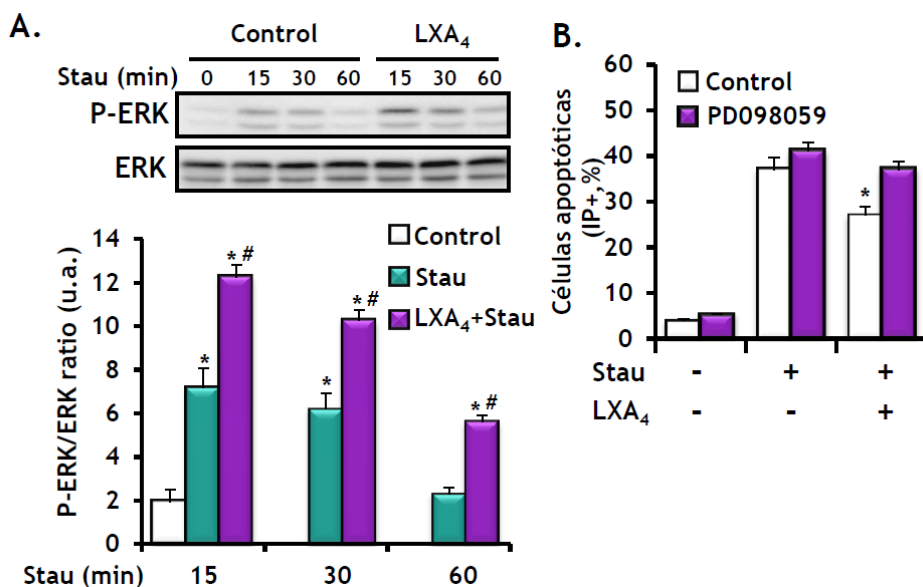


Fig.20. Activación de la vía de ERK tras el tratamiento con LXA₄ en macrófagos peritoneales murinos. **A.** Los macrófagos peritoneales fueron tratados con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). Los niveles de expresión y fosforilación de ERK fueron determinados mediante “Western blot” (se muestra un gel representativo en la parte superior) calculándose el ratio entre la forma fosforilada y la total en todos los casos. El gráfico muestra la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,01$ respecto al control; # $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄. **B.** Los macrófagos peritoneales fueron tratados con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes) y de PD098059 (1 μ M, 30 min antes de la adición de LXA₄). El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado mediante marcaje con IP por citometría de flujo. El gráfico representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

Se determinó que la Stau por sí misma, inducía una leve pero significativa activación de la vía de ERK a 15 y 30 min, mientras que a los 60 min se recuperaban los niveles basales de fosforilación. Las células que fueron pre-tratadas con la LXA₄ presentaban niveles mucho más elevados de fosforilación de ERK, alcanzando niveles máximos a los 15 min.

Para corroborar estos resultados, se analizó si el efecto anti-apoptótico de la LXA₄ se mantenía en presencia del inhibidor PD098059. Las células fueron estimuladas como se indica en la figura 20 (Fig.20B). Los resultados obtenidos indican que las células estimuladas en ausencia del inhibidor estaban protegidas significativamente frente a la apoptosis por el tratamiento con la LXA₄ y este efecto se perdía en presencia de PD098059. Estos resultados ponen de manifiesto que los efectos anti-apoptóticos de la LXA₄ en macrófagos peritoneales también estarían mediados en este caso, por la activación de la vía de ERK.

9.4. Efectos del tratamiento con LXA₄ sobre la activación de la vía de PI3K/Akt.

Para determinar si la LXA₄ era capaz de modular la vía de Akt en macrófagos primarios, estas células fueron estimuladas con LXA₄ a 2 y 5 min y el nivel de fosforilación de Akt fue analizado por “Western blot” (Fig.21A). Se observó que el tratamiento con LXA₄ inducía una rápida fosforilación de la proteína a partir de los 2 min de exposición frente a los niveles basales del control.

Para corroborar la implicación de la vía de Akt en los efectos observados por el tratamiento con LXA₄, se analizó si el efecto anti-apoptótico de este compuesto se mantenía en los macrófagos peritoneales en presencia de LY294002 (Fig.21B).

Los resultados obtenidos indican que la presencia de Stau inducía porcentajes de células apoptóticas cercanos al 40% tanto en presencia como en ausencia del inhibidor. Por otro lado, mientras que el pre-tratamiento con LXA₄

prevenía la apoptosis celular hasta porcentajes inferiores al 30%, la presencia del inhibidor anulaba este efecto. Estos datos señalan a que el efecto anti-apoptótico observado en las células tras el tratamiento con la LXA₄ depende en cierta medida de la activación de la vía de Akt.

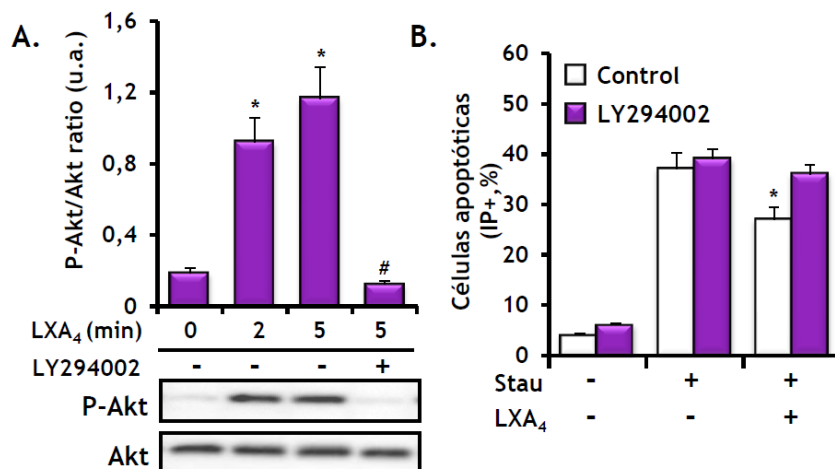


Fig.21. Activación mediada por la LXA₄ de la vía de Akt en macrófagos peritoneales. A. Los macrófagos fueron estimulados con LXA₄ (250 nM) durante 2 y 5 min en presencia o ausencia de LY294002 (10 μ M, 30 min antes). Tanto los niveles de expresión como el grado de fosforilación de Akt en Ser473 fueron analizados en extractos proteicos totales (se muestra un gel representativo en la parte inferior) y se calculó el ratio entre la cantidad de proteína fosforilada y total en cada uno de los puntos. B. Los macrófagos peritoneales fueron tratados con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes) o de LY294002 (10 μ M, 30 min antes de la adición de LXA₄). El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado mediante marcaje con IP por citometría de flujo. Los gráficos que se muestran representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄; # $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LY294002.

10. EL TRATAMIENTO CON LXA₄ EJERCE UN EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS HUMANOS.

10.1. Efectos del tratamiento con LXA₄ en la línea celular THP-1.

10.1.1. Efectos de la LXA₄ sobre la apoptosis.

A continuación quisimos analizar si la LXA₄ mantenía su efecto protector frente a la apoptosis en macrófagos humanos.

Como primera aproximación se utilizó una línea celular monocítica humana, THP-1 que, tras ser sometida a un tratamiento con PMA, es capaz de diferenciarse a macrófago.

En primer lugar se determinó si la LXA₄ mantenía su efecto anti-apoptótico frente a Stau en este tipo celular. Para ello las células fueron tratadas de forma similar a los experimentos anteriores tal y como se indica en la figura (Fig.22A). Nuestros resultados indicaban que la LXA₄ por sí misma generaba un porcentaje de células apoptóticas inferior al 10% a todas de las concentraciones analizadas. Mientras que la adición de Stau aumentó dicho porcentaje hasta el 20%, el pre-tratamiento con concentraciones de LXA₄ superiores a 250 nM redujo este efecto en un 5% aproximadamente.

También se evaluó si la 15-epi-LXA₄ ejercía efectos similares a la LXA₄ en macrófagos humanos (Fig.22B). Se observó que el porcentaje de células apoptóticas cercano al 20% alcanzado tras el tratamiento con Stau se reducía significativamente en presencia de 15-epi-LXA₄ a todas las concentraciones analizadas, siendo más efectiva la dosis de 100 nM, en la que el porcentaje de células apoptóticas fue de aproximadamente el 12%.

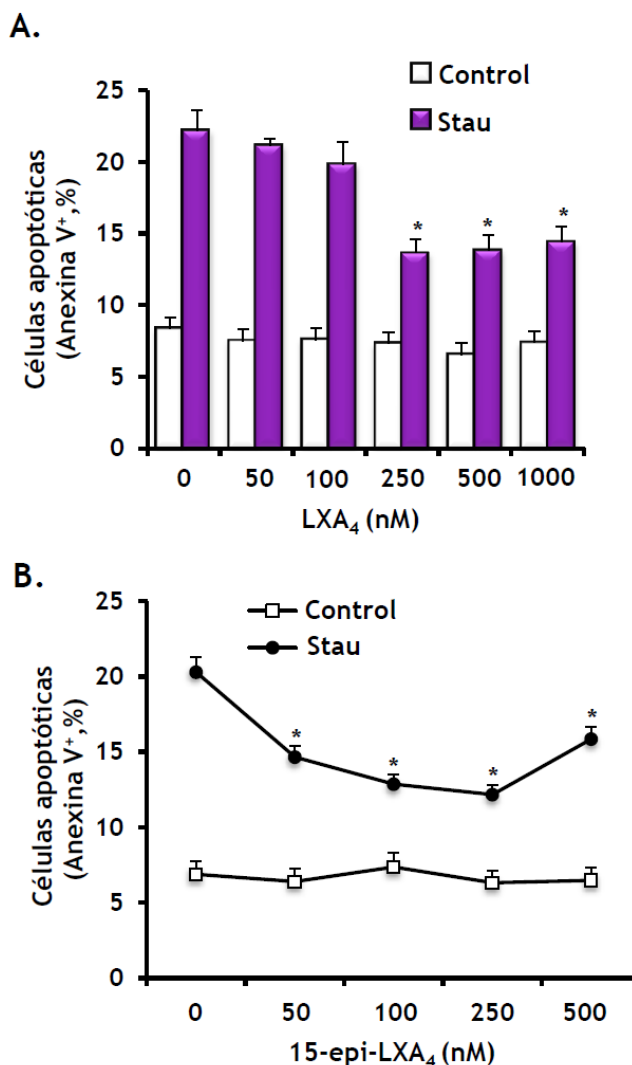


Fig. 22. Efecto protector de LXA₄ y 15-epi-LXA₄ frente a la apoptosis celular inducida por Stau en THP-1. Las células fueron tratadas con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con diferentes concentraciones de LXA₄ (A.) o 15-epi-LXA₄ (B.) durante 2 h. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por citometría de flujo mediante marcaje con anexina V. Los gráficos que se muestran representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ respecto al correspondiente valor en células tratadas únicamente con Stau.

10.1.2. Efecto de la LXA₄ sobre la activación del eje ERK/Nrf-2.

Se comprobó si, al igual que ocurría en macrófagos murinos, el efecto anti-apoptótico de la LXA₄ en macrófagos humanos también era dependiente de la activación de las vías de supervivencia de ERK y Nrf-2. Para ello, las células fueron estimuladas como se indica en la figura y los niveles de expresión de ambas proteínas fueron analizados por “Western blot” (fig.23).

Se determinó que, en el caso de la vía de Nrf-2 (Fig.23A), la Stau por sí misma inducía una leve translocación al núcleo de este factor, alcanzando valores significativos entre 30 y 60 min. El tratamiento previo de dichas células con LXA₄ aumentó el paso de Nrf-2 al núcleo incluso en ausencia de Stau, con valores significativos hasta los 30 min.

En el caso de ERK, se observó que dichas células tenían una elevada activación basal de esta vía (Fig.23B). A pesar de ello, en presencia de LXA₄ los niveles de fosforilación de esta proteína eran mayores, incluso en ausencia de Stau, aunque en este caso el efecto desaparecía a tiempos superiores a 15 min.

10.2. Efectos del tratamiento con LXA₄ en macrófagos humanos primarios.

10.2.1. Efectos de la LXA₄ sobre la apoptosis.

Posteriormente, quisimos corroborar los resultados anteriores analizando el papel de la LXA₄ en macrófagos primarios aislados a partir de sangre humana.

En primer lugar se estudiaron los efectos de la LXA₄ sobre la apoptosis inducida con Stau en estas células. Las células fueron tratadas con este compuesto pro-apoptótico en presencia o ausencia del pre-tratamiento con la LXA₄ tal y como se indica en la figura y el porcentaje de células positivas para anexina V fue cuantificado por citometría de flujo (Fig.24A).

Se confirmó que la LXA₄ por sí misma no resultaba tóxica para estas células, manteniendo niveles basales de apoptosis ($\leq 10\%$). El aumento en el

porcentaje de células apoptóticas observado tras el tratamiento con Stau se redujo aproximadamente a la mitad en presencia de LXA₄.

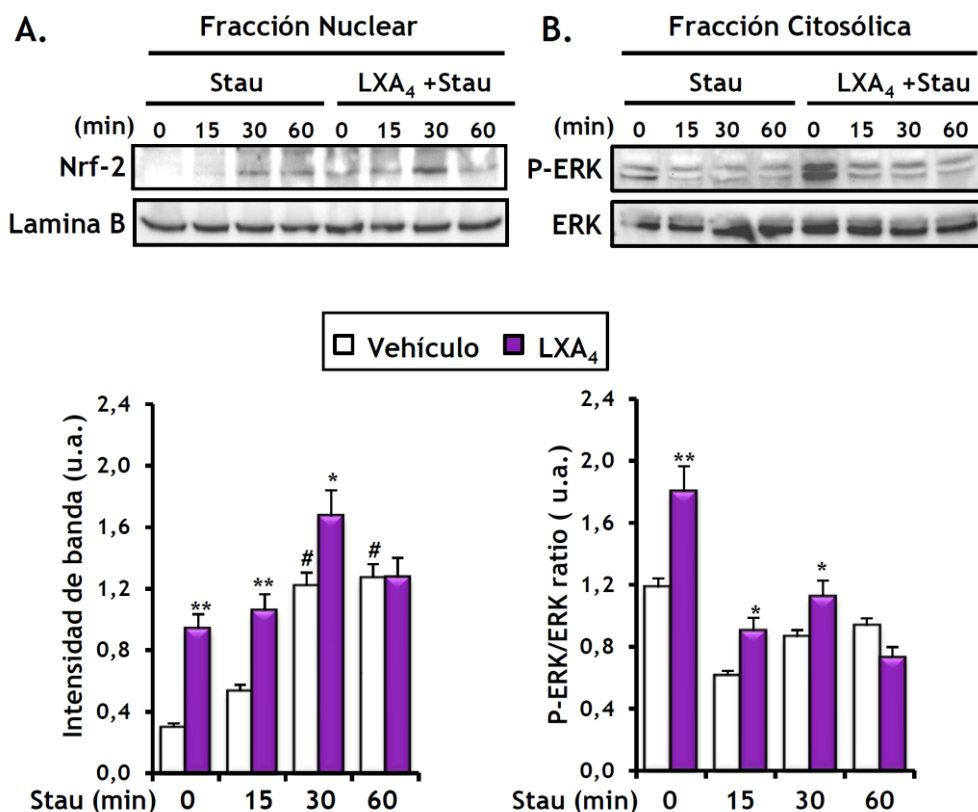


Fig. 23. Activación de ERK y Nrf-2 por el tratamiento con LXA₄ en células THP-1. A. Las células fueron estimuladas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). Los niveles de Nrf-2 fueron analizados en extractos proteicos nucleares utilizando Lamina B como normalizador de carga. B. Las células fueron tratadas como en A. y los niveles de expresión y fosforilación de ERK fueron analizados en extractos proteicos citosólicos. Se muestra un gel representativo de cada caso en la parte superior de la figura. Se calculó el ratio entre la cantidad de proteína fosforilada y total presente en cada una de las muestras analizadas. Los gráficos que se muestran representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. # $p \leq 0,01$ respecto al control sin Stau; * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

En cuanto al efecto protector frente a la apoptosis del análogo 15-epi-LXA₄ en este modelo, se realizaron los experimentos en las mismas condiciones que en el caso de la línea celular THP-1 y se analizó la apoptosis por citometría de flujo (Fig.24B). Se determinó que la 15-epi-LXA₄ no inducía una reducción significativa del porcentaje de células apoptóticas obtenido en presencia de Stau.

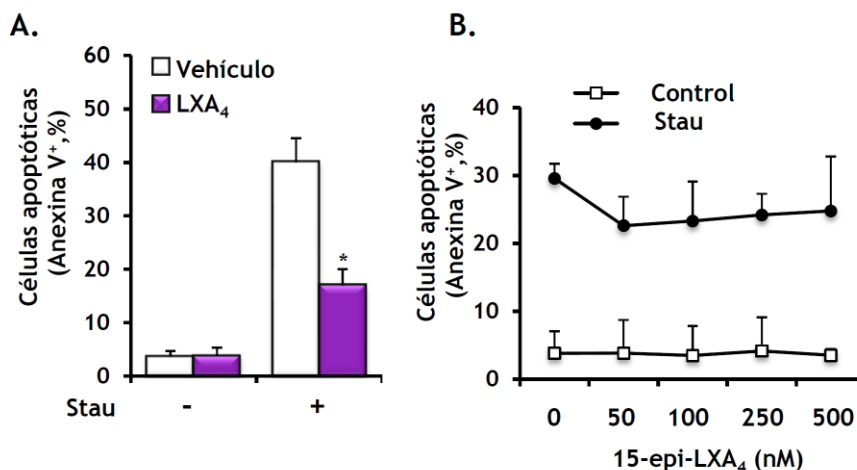


Fig.24. Inhibición de la apoptosis inducida con Stau en macrófagos humanos tras el tratamiento con LXA₄. Los macrófagos primarios humanos fueron estimulados con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ 250 nM (A.) o de diferentes concentraciones de 15-epi-LXA₄ (B.) 2 h antes. El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado por citometría de flujo mediante marcaje de las células con anexina V. Los gráficos que se muestran representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

10.2.2. Efectos de la LXA₄ sobre la activación del eje ERK/Nrf-2.

Quisimos confirmar si el efecto de la LXA₄ observado en macrófagos humanos dependía de las vías de señalización de ERK y Nrf-2, en concordancia con nuestros resultados anteriores.

Las células fueron tratadas tal y como se indica en la figura y los niveles proteicos de Nrf-2 en el núcleo se determinaron mediante “Western blot” (Fig.25A).

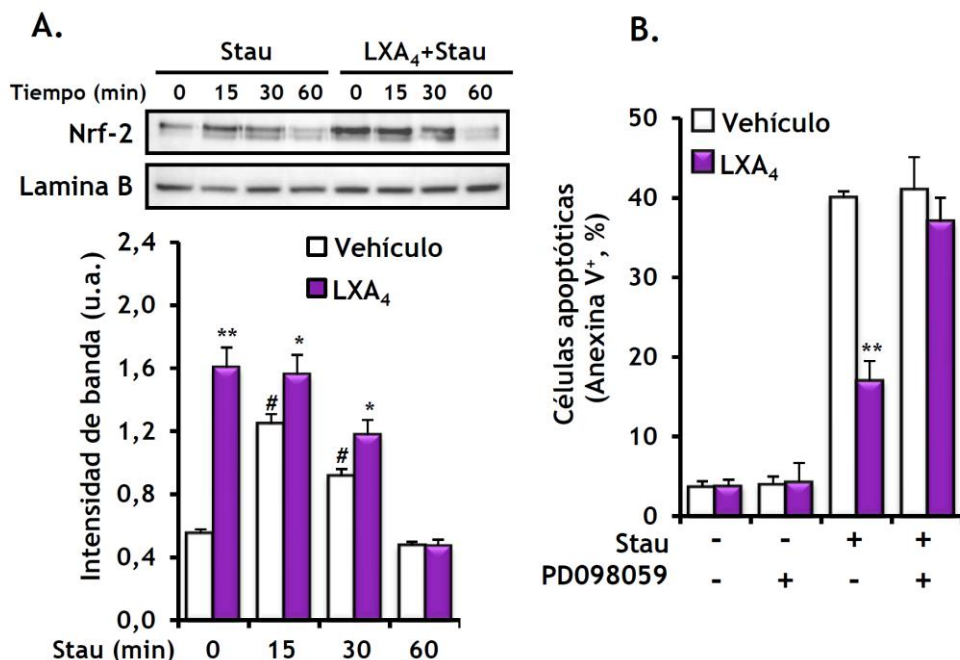


Fig.25. Activación de ERK y Nrf-2 mediada por la LXA₄ en macrófagos humanos. A. Las células fueron estimuladas con Stau (200 ng/ml) a los tiempos indicados en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes). Los niveles proteicos de Nrf-2 fueron analizados y cuantificados en extractos nucleares utilizando Lamina B como normalizador de carga. Se muestra un gel representativo en la parte superior. B. Los macrófagos humanos fueron tratados con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes) y/o de PD098059 (1 μ M, 30 min antes de la adición de LXA₄). El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado mediante marcaje con anexina V por citometría de flujo. Los gráficos muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. # $p \leq 0,05$ respecto al control sin tratar; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄.

En el caso de Nrf-2 se observó que el tratamiento con Stau inducía su translocación al núcleo, alcanzando valores significativos a 15 y 30 min (Fig.25A). La presencia de LXA₄ potenciaba este efecto incluso en los controles sin Stau, que se mantenía hasta los 30 min de estimulación.

En el caso de la activación de ERK (Fig.25B), se realizó una aproximación indirecta mediante el uso del inhibidor farmacológico PD098059. Puesto que el efecto anti-apoptótico de la LXA₄ no se mantenía en presencia de dicho inhibidor, nuestros resultados indicaban que la vía de ERK tiene una importante implicación en la protección generada por la LXA₄, como ya habíamos señalado con anterioridad.

10.2.3. Efecto de la LXA₄ sobre la vía de Akt.

Por último se estudió si, al igual que ocurría en RAW 264.7, el tratamiento con LXA₄ inducía la activación de la vía de Akt en macrófagos humanos. Para ello, dichas células fueron tratadas con LXA₄ durante 2 y 5 min y los niveles de expresión y fosforilación de Akt fueron determinados por “Western blot”. Se observó que el tratamiento con LXA₄ a tiempos muy cortos inducía un aumento significativo en los niveles de fosforilación de Akt (Fig.26A).

Para finalizar, se comprobó si los efectos de la LXA₄ eran dependientes de la activación de Akt. Para ello se utilizó el inhibidor farmacológico LY294002, manteniendo las mismas condiciones en cuanto a tiempo y concentración que en los experimentos realizados con las células de ratón (Fig.26B). Se determinó que el inhibidor no poseía un efecto tóxico en nuestras células, puesto que en su presencia obtuvimos valores de apoptosis inferiores al 10%. El tratamiento con Stau elevó la apoptosis en los macrófagos humanos hasta porcentajes superiores al 40% respecto a la población celular total, reduciéndose a la mitad en presencia de LXA₄. Este efecto anti-apoptótico desapareció al añadir LY294002, indicando que los efectos de la lipoxina dependen también de la activación de la vía de supervivencia celular Akt.

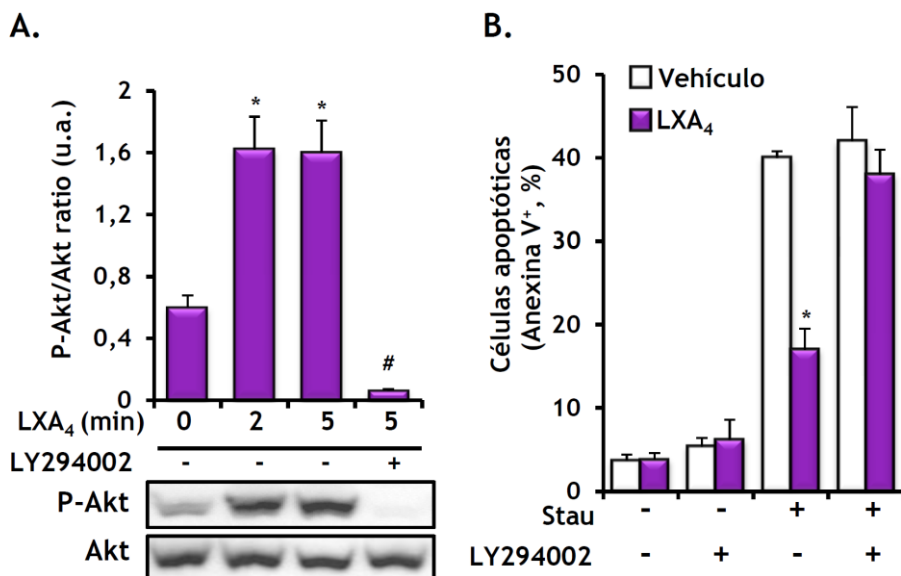


Fig.26. Activación de Akt en macrófagos humanos tras el tratamiento con LXA₄. A. Los macrófagos primarios humanos fueron estimulados con LXA₄ (250 nM) durante 2 y 5 min. El inhibidor farmacológico LY294002 fue utilizado como control (10 μ M, 30 min antes). Tanto los niveles de expresión como el grado de fosforilación de Akt en Ser473 fueron analizados en extractos proteicos totales y se calculó el ratio entre la cantidad de proteína fosforilada y total en cada uno de los puntos. Se muestra un gel representativo en la parte inferior. B. Los macrófagos humanos fueron tratados con Stau (200 ng/ml, 4 h) en presencia o ausencia de LXA₄ (250 nM, 2 h antes) y/o de LY294002 (10 μ M, 30 min antes de la adición de LXA₄). El porcentaje de células apoptóticas fue cuantificado mediante marcaje con anexina V por citometría de flujo. Los gráficos que se muestran representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. * $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LXA₄; # $p \leq 0,01$ respecto al correspondiente valor en ausencia de LY294002.

Discusión

○ Contextualización

La inflamación es un proceso conocido desde la antigüedad, que se encuentra altamente regulado y que tiene lugar en el organismo en respuesta a daños de tipo traumático, infeccioso, isquémico, tóxico o autoinmune. Su principal función es eliminar el daño y permitir que el tejido afectado recupere la homeostasis. Una mala regulación del proceso inflamatorio puede dar lugar, no sólo a la aparición de infecciones de diversa consideración a nivel sistémico, sino también a un gran número de patologías. Entre ellas se encuentran muchas enfermedades consideradas tradicionalmente como inflamatorias como son la aterosclerosis o la artritis reumatoide, así como otras cuyo trasfondo inflamatorio ha sido descrito recientemente como diabetes, asma, Parkinson, Alzheimer, o cáncer. Puesto que en la actualidad, algunas de estas patologías poseen una alta prevalencia y mortalidad poblacional, es fundamental conocer los mecanismos moleculares y celulares que regulan la respuesta inflamatoria.

Los neutrófilos, monocitos y macrófagos, que proceden de un precursor común en la médula ósea, cooperan durante el inicio, progresión y resolución de los procesos inflamatorios (Soehnlein and Lindbom, 2010). Los neutrófilos son células inmunes de vida corta (generalmente horas), que llegan en primer lugar a la zona afectada, atraídos por las células residentes tras detectar daño tisular o invasión microbiana. Su función básica es la destrucción de los microorganismos dañinos mediante la liberación del contenido tóxico de sus vesículas de secreción y la producción de radicales libres con potente actividad antimicrobiana (Nathan, 2006). Todos estos productos son nocivos y pueden resultar muy perjudiciales para las propias células y tejidos del organismo huésped. Por lo tanto, el número y grado de activación de los neutrófilos deben estar altamente controlados para evitar daño celular o tisular excesivo. Debido a ello, una vez que estas células han realizado su función, sufren un proceso fisiológico de muerte celular por apoptosis fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune.

El siguiente paso en el proceso inflamatorio consiste en la llegada de los monocitos a la zona afectada, que al entrar en los tejidos sufren un proceso de diferenciación a macrófagos. Éstos fagocitan las células muertas y restos celulares para permitir que la inflamación finalice de forma adecuada en un proceso activo conocido como “fase de resolución”. Una vez que el agente nocivo ha sido eliminado, en la zona afectada se promueve un cambio gradual en la liberación de mediadores lipídicos. Desde PGs y LTs, cuya finalidad es la amplificación de la respuesta inflamatoria, hacia otros compuestos con capacidad anti-inflamatoria o “resolutiva” como son las lipoxinas y las recientemente descubiertas resolvinas y protectinas (Serhan et al., 2008a).

Desde su descubrimiento a finales de los años 80, la inmensa mayoría de estudios realizados con lipoxinas se han centrado en su papel como anti-inflamatorios, destacando su efectividad en diferentes modelos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Serhan, 2005). En cambio, los efectos de estos compuestos en otras funciones celulares básicas como la apoptosis no se conocen en profundidad y existen únicamente una decena de estudios en este sentido. En términos de resolución, la apoptosis de los neutrófilos es un proceso fundamental y por este motivo la mayoría de los estudios que relacionan las lipoxinas con apoptosis han sido realizados en este tipo celular. Se ha descrito que estos compuestos inducen apoptosis en neutrófilos y esto parece ser básico para finalizar la inflamación de una forma eficiente (El Kebir et al., 2008). En este mismo contexto, no se había estudiado nunca el papel que las lipoxinas ejercen sobre la viabilidad de los macrófagos. Es necesario que estas células permanezcan con vida durante más tiempo para que puedan eliminar de forma eficiente todos los restos celulares. Por tanto en el presente trabajo nos planteamos que sería lógico que la LXA₄, a la vez que potencia la apoptosis de los neutrófilos que deben ser eliminados del área inflamada, podría jugar un papel en el mantenimiento de la viabilidad de los macrófagos. Nuestros resultados demuestran por primera vez, un efecto anti-apoptótico de la LXA₄ en macrófagos y sugieren las vías de señalización implicadas mediante diferentes abordajes bioquímicos y moleculares. Los datos obtenidos apuntan a que el

tratamiento con LXA₄ activa dos de las principales vías de supervivencia a nivel celular como son ERK y Akt. Asimismo, este mediador es capaz de potenciar la activación del factor de transcripción Nrf-2 generando como producto final HO-1 y promoviendo así la puesta en marcha de la maquinaria celular de defensa antioxidante.

○ Análisis de los resultados

En primer lugar analizamos el efecto de la LXA₄ frente a la apoptosis inducida por Stau en macrófagos murinos. Este compuesto antitumoral promueve apoptosis principalmente a través de la vía de señalización mitocondrial, aunque se ha descrito que también es capaz de activar otras vías dependiendo del tipo y contexto celular (Zhang et al., 2004). Nuestros resultados muestran que el pre-tratamiento con LXA₄ posee un notable efecto anti-apoptótico en macrófagos murinos. Pensamos que esto podía estar reflejando una situación inflamatoria bastante “realista” donde los macrófagos entrarían en contacto con estos lípidos y pondrían en marcha su mecanismo de acción antes de ser expuestos a los diferentes agentes patógenos.

Por otro lado y puesto que se ha descrito que las líneas celulares pueden presentar distinta sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos (Antonsson and Persson, 2009), quisimos confirmar los efectos anti-apoptóticos de la LXA₄ exponiendo las células a un agente diferente, el etopósido. Apoyando nuestros datos previos y a pesar de que las RAW 264.7 presentaban más resistencia a este compuesto, se mantuvieron los efectos protectores frente a la apoptosis. También fuimos capaces de corroborar estos resultados frente a otros estímulos pro-apoptóticos como LPS/IFN γ o GSNO. Ambos inducen la generación de grandes cantidades de NO que a tiempos largos y/o concentraciones elevadas es capaz de inducir la apoptosis en macrófagos (Bosca and Hortelano, 1999; Bosca et al., 2005). Basándonos en estos datos, la LXA₄ parecía ser un importante agente anti-apoptótico en macrófagos murinos, capaz de mantener sus efectos frente a estímulos nocivos de diversa etiología.

Un aspecto que actualmente es objeto de un intenso debate es el mecanismo molecular a través del que las lipoxinas ejercen su función. En este sentido, se ha descrito que pueden interaccionar con diferentes receptores situados en la superficie celular. En concreto existe un receptor específico, que posee una alta afinidad por la LXA₄, conocido como ALX. Una de las metodologías más utilizadas para determinar si los efectos que ejerce la LXA₄ están mediados por este receptor, es el uso de péptidos antagonistas como Boc-2 (Cezar-de-Mello et al., 2006; Menezes-de-Lima et al., 2006; Stenfeldt et al., 2007). Tanto los resultados obtenidos en la línea celular como en macrófagos peritoneales de ratón utilizando este abordaje, indican que la interacción de la LXA₄ con ALX es responsable, al menos en parte, de los efectos anti-apoptóticos observados. Estos efectos se encuentran dentro del rango nanomolar, en el que las lipoxinas son producidas “*in vivo*” en condiciones fisiopatológicas. Sin embargo, cabe destacar que las concentraciones efectivas en nuestro modelo están muy por encima de la constante de disociación ($K_d=1,5$ nM) propuesta para ALX en ratón (Takano et al., 1997). Puesto que los estudios de cinética no han sido corroborados en macrófagos, podría ser que este tipo celular requiera mayores concentraciones de LXA₄ para su correcta interacción con el receptor. Por otro lado, determinamos que a concentraciones elevadas de LXA₄ se mantenían los efectos protectores a pesar de la presencia del antagonista. Todo ello nos hizo pensar que la LXA₄ podría estar ejerciendo su función también a través de otra u otras vías paralelas. De hecho se ha descrito que este derivado lipídico es capaz de interaccionar en determinados contextos celulares con otro tipo de receptores como los receptores peptídicos CysLTs (Gronert et al., 2001) o AhR (Machado et al., 2006; Schaldach et al., 1999) regulando la respuesta inmune. Asimismo, se ha sugerido que este lípido podría entrar en las células sin necesidad de interaccionar con ningún tipo de receptor de membrana (Simchowicz et al., 1994). Estos hallazgos abren una nueva vía de investigación puesto que sería muy interesante conocer los posibles mecanismos de acción de la LXA₄ en macrófagos y si éstos son capaces de cooperar entre sí promoviendo vías comunes de señalización.

Sin embargo, a pesar de los potentes efectos anti-inflamatorios de las lipoxinas descritos en diversos modelos, su rápida degradación ha supuesto un problema para su posible aplicación farmacológica. Por ello, en los últimos años se han destinado grandes esfuerzos a la investigación de análogos más estables que, manteniendo la efectividad de los compuestos “nativos”, fueran más resistentes a la degradación (Romano, 2005). En este sentido, a finales de los años 90 se describió una vía de producción de epímeros de lipoxinas mediada por acción de la aspirina (Claria and Serhan, 1995). Posteriormente se desarrollaron diversos estudios en los que se asociaban algunas de las potentes propiedades anti-inflamatorias de este fármaco con la formación de la 15-epi-LXA₄. Se determinó además que su tasa de degradación era menor que la de los compuestos “nativos” (Clish et al., 1999) y se sugería que debían presentar efectos muy prometedores en clínica debido a su mayor permanencia en el organismo (Serhan, 2005; Serhan et al., 2008b). Con estos antecedentes nos planteamos si tendría un efecto protector más potente que la LXA₄ en nuestro modelo. De forma sorprendente, comprobamos que el tratamiento de los macrófagos murinos con 15-epi-LXA₄ no poseía un efecto anti-apoptótico frente a Stau, ni siquiera a las dosis más elevadas. Un resultado similar se había obtenido recientemente en neutrófilos por El Kebir y colaboradores, donde la 15-epi-LXA₄ no parecía tener efectos directos sobre la viabilidad celular (El Kebir et al., 2007). A la vista de estos datos nos planteamos que en nuestro modelo este compuesto podría requerir diferentes concentraciones o tiempos de exposición para reproducir los efectos que se observan con la LXA₄. Otra posibilidad es que la 15-epi-LXA₄ no esté siendo capaz de interaccionar correctamente con su/s receptor/es. Este punto es controvertido puesto que debido a su gran similitud estructural con la LXA₄, parece ser un potente ligando para ALX en algunos modelos patológicos aunque no se descarta su interacción con otro tipo de receptores, aun por determinar. Suponiendo que la 15-epi-LXA₄ active su señalización a través ALX en macrófagos es posible que no consiga desencadenar en el mismo los cambios de conformación adecuados para activar las vías de señalización pertinentes (Chiang et al., 2006). En este sentido sería

necesario ampliar la investigación para esclarecer el mecanismo molecular implicado. Una aproximación experimental que podría despejar muchas incógnitas en este punto podría ser el uso de animales deficientes en ALX generados recientemente (Dufton et al., 2010).

Nuestro siguiente objetivo se centró en comprobar el papel de la LXA₄ sobre la activación de las caspasas, proteasas fundamentales en casi todas las vías de señalización apoptóticas. Comprobamos que dicho mediador poseía un potente efecto inhibitor de las mismas, lo que explicaría los resultados presentados anteriormente. A continuación quisimos profundizar en las vías de señalización que podrían estar moduladas por la LXA₄. La vía apoptótica extrínseca parece tener poca relevancia en nuestro modelo de macrófagos murinos, puesto que el tratamiento con ligandos específicos no induce aumentos notables en los porcentajes de apoptosis. Esto podría ser debido a una inadecuada activación de la vía de los “receptores de muerte” en este modelo. Podría ser que los clones celulares de RAW 264.7 utilizados no sean capaces de responder adecuadamente a estos estímulos por sí mismos.

Esto, junto con el hecho de que la LXA₄ presentase un potente efecto anti-apoptótico frente a Stau, nos hizo pensar que la vía apoptótica mitocondrial podría estar afectada por la acción de este lípido. Debido a ello decidimos analizar si la LXA₄ estaba regulando de alguna manera la activación de las proteínas de la familia Bcl-2. Nuestros resultados están en consonancia con estudios recientes que parecen indicar que las proteínas de dicha familia no están reguladas a nivel transcripcional sino que las células poseen unos niveles basales de estas proteínas que son suficientes para inducir apoptosis (Chipuk et al., 2010). En este sentido, los niveles proteicos de Bax no se modificaron en presencia de LXA₄. Este resultado no fue sorprendente, puesto que se ha descrito que la actividad de Bax está regulada fundamentalmente a nivel post-traducciona, asociada con cambios conformacionales, fosforilaciones o degradación proteasomal (Fu et al., 2009). Por otro lado, los niveles proteicos de Bcl-2 se modificaron únicamente a tiempos largos. Este resultado también está de acuerdo con lo descrito previamente donde se propone una regulación

de dicha proteína principalmente por cambios en su localización celular o por variaciones en sus interacciones con miembros apoptóticos de la familia (Youle and Strasser, 2008). Por el contrario, sí fuimos capaces de detectar aumentos en los niveles proteicos de Mcl-1 y X-IAP en presencia de LXA₄. Esto se debe a que ambas proteínas están reguladas principalmente por degradación proteasomal (Galban and Duckett, 2010; Schwickart et al., 2010), aunque Mcl-1 también puede estar regulada post-transcripcionalmente para prevenir apoptosis (Cuconati et al., 2003). En conjunto, estos resultados parecen indicar que la LXA₄ estaría regulando de forma efectiva los niveles proteicos de determinados miembros de la familia Bcl-2 y de las IAPs. Así estaría manteniendo bajos los niveles de las proteínas implicadas en la formación de poros en la membrana mitocondrial e inclinando globalmente la balanza a favor de un fenotipo anti-apoptótico. En este contexto, puesto que algunas proteínas de la familia Bcl-2 han sido recientemente implicadas en la modulación de autofagia (Glick et al., 2010; Maiuri et al., 2007), no es descabellado pensar que la LXA₄ podría jugar también un papel en este proceso celular. Aunque la autofagia fue descrita como un mecanismo de supervivencia celular en situaciones de ayuno o estrés, hoy en día se considera como un tipo de muerte celular alternativo a la apoptosis que tiene lugar en determinados contextos celulares (Platini et al., 2010). Por tanto, sería interesante estudiar en el futuro si la LXA₄ posee un papel en la modulación de estos procesos.

De acuerdo con los resultados previos, nos pareció lógico que la LXA₄ podría estar afectando a la liberación de mediadores apoptóticos al citoplasma. El hecho de que el tratamiento con LXA₄ induzca una menor salida tanto de citocromo c como de AIF desde la mitocondria, confirma su papel sobre esta vía apoptótica. A finales de los años 90 aparecieron una serie de estudios en los que la microinyección directa del citocromo c en el citoplasma de varios tipos celulares de mamífero desencadenaba apoptosis (Li et al., 1997; Zhivotovsky et al., 1998). Esto ha promovido que en los últimos años se haya hecho un gran esfuerzo por conocer la implicación concreta del citocromo c en apoptosis y determinar si su salida al citoplasma es un proceso fundamental para que se

desencadene el proceso apoptótico. La liberación de este mediador mitocondrial se produce de forma rápida en muchos tipos celulares debido a su bajo peso molecular. Así, dependiendo de la cantidad de citocromo c liberada, la puesta en marcha del proceso apoptótico puede llegar a ser irreversible (Khodjakov et al., 2004). Estos resultados concuerdan con nuestros datos previos de forma que la LXA₄ estaría disminuyendo la formación de poros en la membrana mitocondrial y reteniendo el citocromo c en este orgánulo celular, impidiendo así el desarrollo de apoptosis.

Por otro lado, la activación de AIF parece depender tanto de su liberación al citoplasma, como de su traslocación al núcleo donde participa en la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina (Cheung et al., 2006). Puesto que hemos comprobado que la LXA₄ es capaz de modular la primera parte del proceso de activación de esta proteína, sería interesante analizar en el futuro si dicho lípido posee efectos sobre la entrada de este mediador apoptótico al núcleo celular.

Una vez comprobado el efecto anti-apoptótico de la LXA₄ en este modelo, nuestro siguiente paso fue determinar las vías de señalización que podían estar implicadas en el mismo. Dentro de las vías de las MAPKs, la activación de ERK ha sido ampliamente relacionada con supervivencia celular (Erhardt et al., 1999; Le Gall et al., 2000), por lo que se le han atribuido incluso funciones oncogénicas (Balmanno and Cook, 2009). Con estos antecedentes, no nos sorprendió comprobar que la LXA₄ estaba induciendo la activación de esta quinasa en macrófagos murinos. Este efecto, que determinamos en primer lugar analizando los niveles de fosforilación de dicha proteína, fue corroborado también mediante el uso de un inhibidor farmacológico específico, que fue capaz de revertir el efecto protector generado por la LXA₄.

A la vista de estos resultados, nos planteamos si los efectos de la LXA₄ estarían mediados también por la activación de la vía de Akt, que promueve supervivencia en diversos tipos celulares. Al igual que ERK, ésta también se ha relacionado con el desarrollo de varios tipos de cáncer (Carnero, 2010; Dillon and Muller, 2010). Aunque tradicionalmente ambas vías eran consideradas

independientes, esta idea ha cambiado en los últimos años. Actualmente se piensa que pueden interaccionar dependiendo del contexto celular (Grant, 2008; Scheid and Woodgett, 2000). Esto representaría un mecanismo de redundancia funcional en las vías de señalización de supervivencia de las células. Nuestros datos indican que la LXA₄ induce la activación de Akt, detectando niveles más elevados de fosforilación de esta proteína (en su residuo de serina 473) tras el tratamiento. La implicación de Akt en los efectos mediados por la LXA₄ se corroboró mediante el uso del inhibidor farmacológico específico LY294002, en cuya presencia se perdió el efecto protector mediado por dicho lípido.

Otro de los factores más importantes en los procesos apoptóticos es el estrés oxidativo, que induce la producción de moléculas muy tóxicas a nivel celular (Breimer, 1990; Meneghini, 1997). Puesto que detectamos una menor liberación de agentes oxidantes en las células tratadas con LXA₄, nos pareció muy interesante analizar si este compuesto podría estar activando una de las principales vías anti-oxidantes descritas a nivel celular, la vía de Nrf-2 (Kaspar et al., 2009). Nuestros resultados demuestran que este compuesto efectivamente induce la translocación al núcleo de este factor de transcripción, así como una completa activación del mismo, cuantificada mediante su interacción con secuencias ARE. En este punto, cabe destacar que en las células tratadas con LXA₄ y a continuación expuestas a Stau, fuimos capaces de detectar la entrada al núcleo de Nrf-2 pero su activación, medida como actividad luciferasa no alcanzó valores significativos. Por el contrario, la LXA₄ por sí misma, sí fue capaz de activar el promotor de Nrf-2 de forma comparable al control positivo. Pensamos que esto puede ser debido a que el proceso de transfección esté afectando a la integridad de las células impidiendo que activen su maquinaria de transcripción en presencia de Stau.

Apoyándonos en estos datos, quisimos estudiar los efectos de la LXA₄ sobre la HO-1, una proteína regulada por Nrf-2 que representa uno de los principales mecanismos de protección anti-oxidante celular (Gozzelino et al., 2010). Por un lado, defectos en su expresión se han relacionado con el desarrollo de diversas patologías y por otro, su sobreexpresión parece tener potenciales aplicaciones

clínicas (Abraham and Kappas, 2008; Soares and Bach, 2009). Determinamos que la LXA₄ inducía un aumento significativo en los niveles proteicos de HO-1, lo que explicaría la reducción del estrés oxidativo observada previamente.

Para confirmar estos resultados, utilizamos ratones Nrf-2^{-/-} (Itoh et al., 1997). La LXA₄ fue incapaz de mantener sus efectos anti-apoptóticos frente a la Stau en los macrófagos peritoneales de estos animales. Por tanto y teniendo en cuenta todos los datos presentados hasta el momento, la vía anti-oxidante Nrf-2 parece jugar un papel fundamental en los efectos producidos por la LXA₄ en macrófagos murinos.

Puesto que los resultados obtenidos en macrófagos de ratón tras el tratamiento con LXA₄ apuntaban a un importante papel de este compuesto en la resolución de la inflamación, pensamos que era fundamental ver si podíamos reproducirlos en células humanas.

Llevamos a cabo dos aproximaciones. Por un lado decidimos utilizar la línea celular THP-1 y por otro macrófagos primarios aislados de sangre humana. A pesar de que, como cabía esperar, los macrófagos primarios fueron mucho más sensibles a Stau que la línea celular, en ambos casos la LXA₄ tuvo un efecto anti-apoptótico significativo. Cuando analizamos los efectos de la 15-epi-LXA₄ sobre ambos tipos celulares, nos llamó la atención que este compuesto presentara un efecto protector en las THP-1 mientras que en macrófagos primarios humanos los datos seguían una tendencia similar aunque no llegaron a ser significativos. Pensamos que esto podía ser debido a que, puesto que cada muestra de sangre procedía de un donante diferente, las células obtenidas presentaban una elevada variabilidad de respuesta. Sería necesario disponer de un número de muestras más elevado para alcanzar resultados significativos. En cualquier caso, el hecho de que la 15-epi-LXA₄ posea cierto efecto protector en humanos que no detectábamos en ratón podría ser debido a que este compuesto esté interaccionando con receptores diferentes. Aunque, como hemos comentado con anterioridad consideramos que sería necesaria la realización de estudios más detallados para aclarar este aspecto.

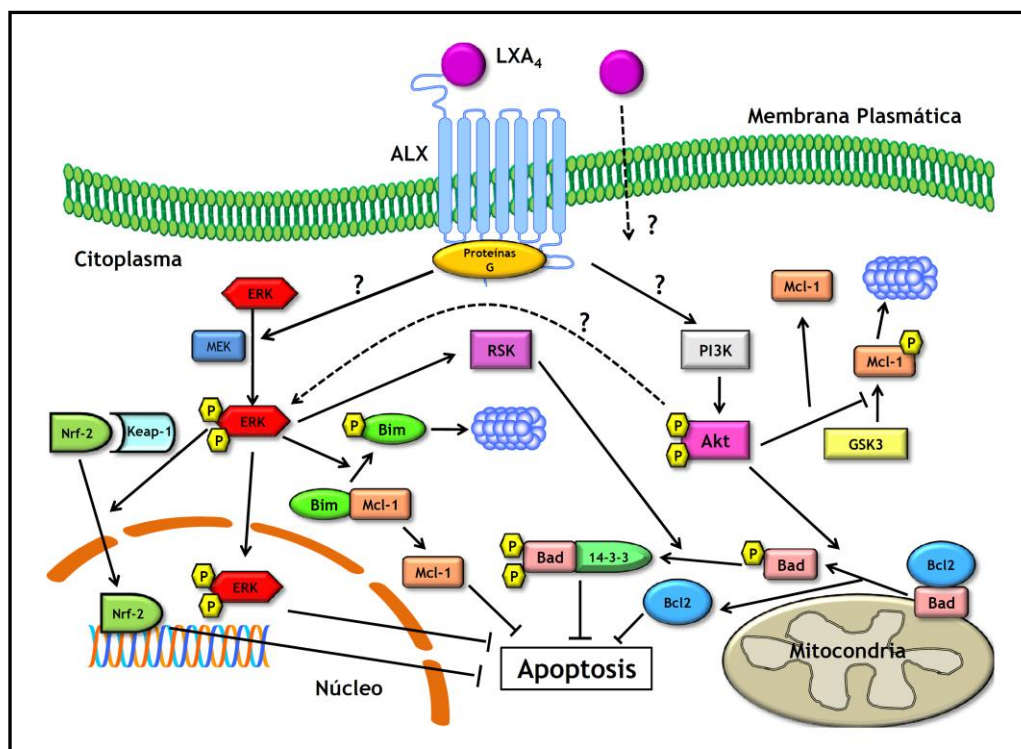
Por otro lado, tanto las THP-1 como los macrófagos primarios humanos son inicialmente células monocíticas, que son sometidas a un proceso de diferenciación en presencia de M-CSF. Se ha descrito que el uso de este tipo de citoquinas induce una rápida activación de diversas vías de señalización, entre ellas la vía de ERK (de Groot et al., 1998; Jack et al., 2009). Este hecho explicaría los elevados niveles basales de activación de ERK que detectamos en THP-1; aun así, los niveles de fosforilación de esta proteína fueron más elevados en presencia de LXA₄. En el caso de los macrófagos humanos, para evitar posibles efectos del M-CSF sobre los niveles de fosforilación de ERK que pudieran enmascarar los efectos de la LXA₄, decidimos abordar este punto de forma indirecta mediante el uso de los inhibidores farmacológicos. Pudimos comprobar que en macrófagos humanos la activación de la vía de ERK era fundamental para los efectos protectores de la LXA₄. A pesar de que, los niveles de activación de Akt también estaban basalmente más elevados tras el proceso de diferenciación (Chang et al., 2003), determinamos que la LXA₄ inducía la activación de esta vía en macrófagos humanos, tanto a través de medidas de los niveles de fosforilación de Akt como mediante el uso de inhibidores farmacológicos específicos.

De forma concordante con los resultados obtenidos en ratón, nuestros datos corroboran que la vía de Nrf-2 estaba activada tanto en THP-1 como en macrófagos humanos tratados con LXA₄. Este hecho apoya nuestra hipótesis de que dicho mediador lipídico estaría activando un eje anti-oxidante como importante mecanismo de defensa en macrófagos.

- **Modelo propuesto.**

Basándonos en los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral, proponemos un modelo del posible mecanismo anti-apoptótico de la LXA₄ en macrófagos (Esquema I). Si nos situamos en el contexto de la fase de resolución de un proceso inflamatorio, las interacciones entre distintos tipos celulares congregados en el área afectada estarían dando lugar a la producción

de LXA₄. Este derivado lipídico entraría en contacto con los macrófagos que llegan a la zona con una función principalmente fagocítica y podría interactuar en la membrana de dichas células con el receptor específico ALX. También parece ser capaz de activar una respuesta en este tipo celular por otros mecanismos, aún por determinar. De uno u otro modo, la LXA₄ activaría un gran número de vías de señalización implicadas en supervivencia celular. Por un lado estaría activando la vía de PI3K/Akt, que a su vez inhibiría la degradación de Mcl-1. Por esta misma ruta, estaría fosforilando a Bad y liberando así a Bcl-2, todos ellos mecanismos anti-apoptóticos.



Esquema I: Modelo de señalización propuesto para la acción de la LXA₄ en macrófagos.

Los mecanismos de acción de la LXA₄ parecen estar mediados también por la activación de la vía de ERK, aunque no está claro si por un mecanismo dependiente o independiente de Akt. ERK por sí mismo puede pasar al núcleo una vez activado y regular directamente la expresión de genes implicados en supervivencia celular. Por otro lado, se ha descrito que puede ejercer distintas acciones sobre las proteínas de la familia Bcl-2. En este sentido, ERK es capaz de promover la fosforilación tanto de Bad como de Bim, liberando las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1. Esta misma vía puede activar al factor de transcripción Nrf-2, permitiendo su entrada al núcleo y potenciando así la defensa anti-oxidante de la célula, induciendo entre otros genes, la expresión de HO-1.

Sin embargo, quedan muchas preguntas abiertas en este modelo. Un punto fundamental es el mecanismo de entrada de la LXA₄ en las células, que parece ser dependiente tanto del tipo celular como de la concentración de lipoxina existente. Tampoco se conoce si existen otras vías de señalización iniciales que conducen a la activación de las rutas de supervivencia de ERK y Akt, ni si existe en este modelo una interacción directa entre ambas quinasas. A pesar de que la implicación de ERK y Akt en supervivencia celular se conoce desde hace años, sólo recientemente han aparecido evidencias de que estas vías regulan directamente la maquinaria apoptótica celular. En este sentido, es necesario profundizar en el mecanismo molecular y las vías de señalización por las que la LXA₄ estaría ejerciendo su acción.

○ Implicaciones del presente trabajo.

Nuestros resultados proponen por primera vez una vía de señalización implicada en los efectos anti-apoptóticos de la LXA₄ en macrófagos. En este sentido la prolongación de la supervivencia de los macrófagos puede jugar un papel fundamental en determinadas situaciones, permitiendo una correcta resolución de la inflamación y evitando la aparición de procesos inflamatorios crónicos (Filep and El Kebir, 2009).

Un aspecto fundamental del presente trabajo es que los efectos de la LXA₄ observados en los modelos murinos, se reproducen en células humanas. Curiosamente y de acuerdo a nuestros resultados, un trabajo muy reciente de Simoes y colaboradores describe que un análogo de la lipoxina es capaz de inhibir la apoptosis en monocitos humanos activando las mismas vías de señalización (Simoes et al., 2010). Esto puede ser necesario en determinadas situaciones inflamatorias severas o prolongadas en las que se requiera que los monocitos sobrevivan durante periodos de tiempo más largos para reemplazar o amplificar el número de macrófagos tisulares extravasados previamente.

En la actualidad, el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias es una de las principales metas en biomedicina. Para ello, es fundamental conocer las vías de señalización implicadas en el desarrollo de estas enfermedades. El presente trabajo abre las puertas a la consideración de la LXA₄ como molécula terapéutica, puesto que debido a sus notables efectos en la resolución de los procesos inflamatorios podría tener aplicaciones a nivel clínico. Reforzando esta idea, se ha propuesto que algunas de las dianas de la LXA₄ que exponemos en el presente trabajo podrían tener aplicaciones terapéuticas por sí mismas. En este sentido, Nrf-2 ha adquirido un papel protagonista en neuroprotección, puesto que el estrés oxidativo se ha propuesto recientemente como un factor crítico en el desarrollo de patologías como el Parkinson (Cuadrado et al., 2009). Por otro lado, la desregulación de las vías de ERK y Akt ha sido ampliamente relacionada con el desarrollo de tumores y otras patologías (Carnero, 2010; Kim and Choi, 2010).

Los datos aportados en la presente Tesis Doctoral han contribuido a un mejor conocimiento de las vías de señalización afectadas por las lipoxinas en diferentes modelos experimentales. Asimismo, potencian la idea de que la LXA₄ posee un potente efecto resolutorio, prolongando la vida de los macrófagos y modulando así la finalización de la respuesta inflamatoria. Esto nos proporciona nuevas dianas para el desarrollo de fármacos destinados al tratamiento de diversas patologías inflamatorias.

Conclusiones

Las principales conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- La lipoxina A₄ (LXA₄) posee un efecto anti-apoptótico en macrófagos murinos y humanos. Dicha protección está mediada, al menos en parte, por su interacción con su receptor específico ALX.

- Los efectos anti-apoptóticos observados en macrófagos se deben principalmente a una inhibición de la vía mitocondrial, a través de los siguientes mecanismos:

- Inducción de una mayor expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2.
- Inhibición de la liberación de mediadores mitocondriales apoptóticos al citoplasma celular.
- Inhibición directa de la activación de las caspasas.

- La LXA₄ promueve supervivencia celular en macrófagos a través de la activación de las vías de señalización de ERK y Akt. Además, reduce el estrés oxidativo mediante la activación del factor de transcripción Nrf-2.

Bibliografía

Abraham, N.G., and Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological reviews* 60, 79-127.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15, 6541-6551.

Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* 5, 162-170.

Aliberti, J., and Bafica, A. (2005). Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 73, 283-288.

Aliberti, J., Serhan, C., and Sher, A. (2002). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of experimental medicine* 196, 1253-1262.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Antonsson, A., and Persson, J.L. (2009). Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G(2)/m checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities. *Anticancer research* 29, 2893-2898.

Ariel, A., Chiang, N., Arita, M., Petasis, N.A., and Serhan, C.N. (2003). Aspirin-triggered lipoxin A4 and B4 analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF- α secretion from human T cells. *J Immunol* 170, 6266-6272.

Artemiadis, A.K., and Anagnostouli, M.C. (2010). Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis. *European neurology* 63, 65-72.

Aslan, J.E., and Thomas, G. (2009). Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10, 1390-1404.

Assrir, N., Soussan, P., Kremsdorf, D., and Rossignol, J.M. (2010). Role of the hepatitis B virus proteins in pro- and anti-apoptotic processes. *Front Biosci* 15, 12-24.

Balmano, K., and Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell death and differentiation* 16, 368-377.

Ballif, B.A., and Blenis, J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12, 397-408.

Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., Diaz, B.L., Cordeiro, R.S., Jose, P.J., Martins, M.A., and Serhan, C.N. (2000). Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. *J Immunol* 164, 2267-2271.

Bannenberg, G.L., Aliberti, J., Hong, S., Sher, A., and Serhan, C. (2004). Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. *The Journal of experimental medicine* 199, 515-523.

Birnbaum, Y., Ye, Y., Lin, Y., Freeberg, S.Y., Nishi, S.P., Martinez, J.D., Huang, M.H., Uretsky, B.F., and Perez-Polo, J.R. (2006). Augmentation of myocardial production of 15-epi-lipoxin-a4 by pioglitazone and atorvastatin in the rat. *Circulation* 114, 929-935.

Bonnans, C., Mainprice, B., Chanez, P., Bousquet, J., and Urbach, V. (2003). Lipoxin A4 stimulates a cytosolic Ca²⁺ increase in human bronchial epithelium. *The Journal of biological chemistry* 278, 10879-10884.

Bosca, L., and Hortelano, S. (1999). Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cellular signalling* 11, 239-244.

Bosca, L., Zeini, M., Traves, P.G., and Hortelano, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* 208, 249-258.

Boucher, M.J., Morisset, J., Vachon, P.H., Reed, J.C., Laine, J., and Rivard, N. (2000). MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 79, 355-369.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Breimer, L.H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Molecular carcinogenesis* 3, 188-197.

Brunt, K.R., Fenrich, K.K., Kiani, G., Tse, M.Y., Pang, S.C., Ward, C.A., and Melo, L.G. (2006). Protection of human vascular smooth muscle cells from H₂O₂-induced apoptosis through functional codependence between HO-1 and AKT. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2027-2034.

Cagnol, S., and Chambard, J.C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS journal* 277, 2-21.

Carnero, A. (2010). The PKB/AKT pathway in cancer. *Current pharmaceutical design* 16, 34-44.

Cezar-de-Mello, P.F., Nascimento-Silva, V., Villela, C.G., and Fierro, I.M. (2006). Aspirin-triggered Lipoxin A4 inhibition of VEGF-induced endothelial cell migration involves actin polymerization and focal adhesion assembly. *Oncogene* 25, 122-129.

Claria, J., and Serhan, C.N. (1995). Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9475-9479.

Cleary, M.L., Smith, S.D., and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19-28.

Clish, C.B., Levy, B.D., Chiang, N., Tai, H.H., and Serhan, C.N. (2000). Oxidoreductases in lipoxin A4 metabolic inactivation: a novel role for 15-onoprostaglandin 13-reductase/leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase in inflammation. *The Journal of biological chemistry* 275, 25372-25380.

Clish, C.B., O'Brien, J.A., Gronert, K., Stahl, G.L., Petasis, N.A., and Serhan, C.N. (1999). Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8247-8252.

Cuadrado, A., Moreno-Murciano, P., and Pedraza-Chaverri, J. (2009). The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert opinion on therapeutic targets* 13, 319-329.

Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., and White, E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes & development* 17, 2922-2932.

Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., and Funk, C.D. (1999). Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 103, 1597-1604.

Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17, 1263-1293.

Chen, Y., Lewis, W., Diwan, A., Cheng, E.H., Matkovich, S.J., and Dorn, G.W., 2nd (2010). Dual autonomous mitochondrial cell death pathways are activated by Nix/BNip3L and induce cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9035-9042.

Cheung, E.C., Joza, N., Steenaart, N.A., McClellan, K.A., Neuspiel, M., McNamara, S., MacLaurin, J.G., Rippstein, P., Park, D.S., Shore, G.C., *et al.* (2006). Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *The EMBO journal* 25, 4061-4073.

Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C.N. (2005). Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 163-177.

Chiang, N., Bermudez, E.A., Ridker, P.M., Hurwitz, S., and Serhan, C.N. (2004). Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15178-15183.

Chiang, N., Fierro, I.M., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2000). Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *The Journal of experimental medicine* 191, 1197-1208.

Chiang, N., Serhan, C.N., Dahlen, S.E., Drazen, J.M., Hay, D.W., Rovati, G.E., Shimizu, T., Yokomizo, T., and Brink, C. (2006). The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacological reviews* 58, 463-487.

Chiang, N., Takano, T., Clish, C.B., Petasis, N.A., Tai, H.H., and Serhan, C.N. (1998). Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA4 ELISA. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 287, 779-790.

Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., and Green, D.R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell death and differentiation* 13, 1396-1402.

Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology* 18, 157-164.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell* 37, 299-310.

Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615-624.

Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 13, 2905-2927.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

- de Groot, R.P., Coffey, P.J., and Koenderman, L. (1998). Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cellular signalling* 10, 619-628.
- Decker, Y., McBean, G., and Godson, C. (2009). Lipoxin A4 inhibits IL-1 β -induced IL-8 and ICAM-1 expression in 1321N1 human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1420-1427.
- Dillon, R.L., and Muller, W.J. (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer research* 70, 4260-4264.
- Divangahi, M., Chen, M., Gan, H., Desjardins, D., Hickman, T.T., Lee, D.M., Fortune, S., Behar, S.M., and Remold, H.G. (2009). Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature immunology*.
- Divangahi, M., Desjardins, D., Nunes-Alves, C., Remold, H.G., and Behar, S.M. (2010). Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Nature immunology* 11, 751-758.
- Dufton, N., Hannon, R., Brancialeone, V., Dalli, J., Patel, H.B., Gray, M., D'Acquisto, F., Buckingham, J.C., Perretti, M., and Flower, R.J. (2010). Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J Immunol* 184, 2611-2619.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* 68, 383-424.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports* 7, 988-994.
- Edenius, C., Kumlin, M., Bjork, T., Anggard, A., and Lindgren, J.A. (1990). Lipoxin formation in human nasal polyps and bronchial tissue. *FEBS letters* 272, 25-28.
- Ehrenschrwender, M., and Wajant, H. (2009). The role of FasL and Fas in health and disease. *Advances in experimental medicine and biology* 647, 64-93.
- El Kebir, D., Jozsef, L., and Filep, J.G. (2008). Opposing regulation of neutrophil apoptosis through the formyl peptide receptor-like 1/lipoxin A4 receptor: implications for resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 84, 600-606.
- El Kebir, D., Jozsef, L., Khreiss, T., Pan, W., Petasis, N.A., Serhan, C.N., and Filep, J.G. (2007). Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol* 179, 616-622.

Erhardt, P., Schremser, E.J., and Cooper, G.M. (1999). B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Molecular and cellular biology* 19, 5308-5315.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L., and Henson, P.M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation* 5, 551-562.

Filep, J.G., and El Kebir, D. (2009). Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *Journal of cellular biochemistry* 108, 1039-1046.

Fiore, S., Maddox, J.F., Perez, H.D., and Serhan, C.N. (1994). Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *The Journal of experimental medicine* 180, 253-260.

Fu, N.Y., Sukumaran, S.K., Kerk, S.Y., and Yu, V.C. (2009). Baxbeta: a constitutively active human Bax isoform that is under tight regulatory control by the proteasomal degradation mechanism. *Molecular cell* 33, 15-29.

Fueller, J., Becker, M., Sienerth, A.R., Fischer, A., Hotz, C., and Galmiche, A. (2008). C-RAF activation promotes BAD poly-ubiquitylation and turn-over by the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications* 370, 552-556.

Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO journal* 16, 1901-1908.

Funk, C.D., and Chen, X.S. (2000). 5-Lipoxygenase and leukotrienes. Transgenic mouse and nuclear targeting studies. *American journal of respiratory and critical care medicine* 161, S120-124.

Funk, C.D., Chen, X.S., Johnson, E.N., and Zhao, L. (2002). Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 303-312.

Galban, S., and Duckett, C.S. (2010). XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell death and differentiation* 17, 54-60.

Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasch, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 279, 21085-21095.

Gavins, F.N., Sawmynaden, P., Chatterjee, B.E., and Perretti, M. (2005). A twist in anti-inflammation: annexin 1 acts via the lipoxin A4 receptor. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 211-219.

George, J., Afek, A., Shaish, A., Levkovitz, H., Bloom, N., Cyrus, T., Zhao, L., Funk, C.D., Sigal, E., and Harats, D. (2001). 12/15-Lipoxygenase gene disruption

attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 104, 1646-1650.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 221, 3-12.

Godson, C., Mitchell, S., Harvey, K., Petasis, N.A., Hogg, N., and Brady, H.R. (2000). Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 164, 1663-1667.

Goh, J., Baird, A.W., O'Keane, C., Watson, R.W., Cottell, D., Bernasconi, G., Petasis, N.A., Godson, C., Brady, H.R., and MacMathuna, P. (2001). Lipoxin A(4) and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A(4) antagonize TNF-alpha-stimulated neutrophil-enterocyte interactions in vitro and attenuate TNF-alpha-induced chemokine release and colonocyte apoptosis in human intestinal mucosa ex vivo. *J Immunol* 167, 2772-2780.

Gozzelino, R., Jeney, V., and Soares, M.P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 323-354.

Grant, S. (2008). Cotargeting survival signaling pathways in cancer. *The Journal of clinical investigation* 118, 3003-3006.

Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94, 695-698.

Green, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y)* 305, 626-629.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 281, 1309-1312.

Gronert, K., Gewirtz, A., Madara, J.L., and Serhan, C.N. (1998). Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *The Journal of experimental medicine* 187, 1285-1294.

Gronert, K., Martinsson-Niskanen, T., Ravasi, S., Chiang, N., and Serhan, C.N. (2001). Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *The American journal of pathology* 158, 3-9.

Guilford, W.J., Bauman, J.G., Skuballa, W., Bauer, S., Wei, G.P., Davey, D., Schaefer, C., Mallari, C., Terkelsen, J., Tseng, J.L., *et al.* (2004). Novel 3-oxa lipoxin A4 analogues with enhanced chemical and metabolic stability have anti-inflammatory activity in vivo. *Journal of medicinal chemistry* 47, 2157-2165.

Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 561-574.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., *et al.* (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.

Hashimoto, A., Murakami, Y., Kitasato, H., Hayashi, I., and Endo, H. (2007). Glucocorticoids co-interact with lipoxin A4 via lipoxin A4 receptor (ALX) up-regulation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 61, 81-85.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Herbein, G., Gras, G., Khan, K.A., and Abbas, W. (2010). Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* 7, 34.

Hortelano, S., Zeini, M., Castrillo, A., Alvarez, A.M., and Bosca, L. (2002). Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease. *Cell death and differentiation* 9, 643-650.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. *The New England journal of medicine* 361, 1570-1583.

Irvin, C.G., Tu, Y.P., Sheller, J.R., and Funk, C.D. (1997). 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *The American journal of physiology* 272, L1053-1058.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., *et al.* (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236, 313-322.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13, 76-86.

Jack, G.D., Zhang, L., and Friedman, A.D. (2009). M-CSF elevates c-Fos and phospho-C/EBPalpha(S21) via ERK whereas G-CSF stimulates SHP2 phosphorylation in marrow progenitors to contribute to myeloid lineage specification. *Blood* 114, 2172-2180.

Johnson, E.N., Brass, L.F., and Funk, C.D. (1998). Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3100-3105.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Jozsef, L., Zouki, C., Petasis, N.A., Serhan, C.N., and Filep, J.G. (2002). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13266-13271.

Kaminsky, V., and Zhivotovsky, B. (2010). To kill or be killed: how viruses interact with the cell death machinery. *Journal of internal medicine* 267, 473-482.

Kandel, E.S., and Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research* 253, 210-229.

Kang, K.A., Lee, K.H., Park, J.W., Lee, N.H., Na, H.K., Surh, Y.J., You, H.J., Chung, M.H., and Hyun, J.W. (2007). Triphlorethol-A induces heme oxygenase-1 via activation of ERK and NF-E2 related factor 2 transcription factor. *FEBS letters* 581, 2000-2008.

Kang, K.W., Lee, S.J., and Kim, S.G. (2005). Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1664-1673.

Kang, K.W., Lee, S.J., Park, J.W., and Kim, S.G. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Molecular pharmacology* 62, 1001-1010.

Kantarci, A., and Van Dyke, T.E. (2003). Lipoxins in chronic inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 14, 4-12.

Kantarci, A., and Van Dyke, T.E. (2005). Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 76, 2168-2174.

Kaspar, J.W., Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 47, 1304-1309.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

Keyes, K.T., Ye, Y., Lin, Y., Zhang, C., Perez-Polo, J.R., Gjorstrup, P., and Birnbaum, Y. (2010). Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *American journal of physiology* 299, H153-164.

Khodjakov, A., Rieder, C., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. (2004). Laser micro-irradiation of mitochondria: is there an amplified mitochondrial death signal in neural cells? *Mitochondrion* 3, 217-227.

Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.

Kim, E.K., and Choi, E.J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1802, 396-405.

Kopp, E., and Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science (New York, N.Y)* 265, 956-959.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87, 99-163.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16, 3-11.

Kuhn, H. (2000). Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. *Prostaglandins & other lipid mediators* 62, 255-270.

Kuhn, H., Schewe, T., and Rapoport, S.M. (1986). The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 58, 273-311.

Kuhn, H., and Thiele, B.J. (1999). The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS letters* 449, 7-11.

Kuo, M.L., Chuang, S.E., Lin, M.T., and Yang, S.Y. (2001). The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. *Oncogene* 20, 677-685.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12, 887-896.

Le Gall, M., Chambard, J.C., Breittmayer, J.P., Grall, D., Pouyssegur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (2000). The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis

induced by anchorage and serum removal. *Molecular biology of the cell* 11, 1103-1112.

Lee, T.H., Crea, A.E., Gant, V., Spur, B.W., Marron, B.E., Nicolaou, K.C., Reardon, E., Brezinski, M., and Serhan, C.N. (1990). Identification of lipoxin A4 and its relationship to the sulfidopeptide leukotrienes C4, D4, and E4 in the bronchoalveolar lavage fluids obtained from patients with selected pulmonary diseases. *Am Rev Respir Dis* 141, 1453-1458.

Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology* 2, 612-619.

Levy, B.D., De Sanctis, G.T., Devchand, P.R., Kim, E., Ackerman, K., Schmidt, B.A., Szczeklik, W., Drazen, J.M., and Serhan, C.N. (2002). Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nat Med* 8, 1018-1023.

Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., Howes, E., Balmanno, K., and Cook, S.J. (2004). Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover. *The Journal of biological chemistry* 279, 8837-8847.

Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J., and Fritz, L.C. (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry* 272, 30299-30305.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Liu, H., Perlman, H., Pagliari, L.J., and Pope, R.M. (2001). Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *The Journal of experimental medicine* 194, 113-126.

Lockshin RA, W.C. (1964). Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology* 10, 6.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111, 846-855.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Mackay, I.R. (2009). Clustering and commonalities among autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 33, 170-177.

Machado, F.S., Johndrow, J.E., Esper, L., Dias, A., Bafica, A., Serhan, C.N., and Aliberti, J. (2006). Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med* 12, 330-334.

Maddox, J.F., Hachicha, M., Takano, T., Petasis, N.A., Fokin, V.V., and Serhan, C.N. (1997). Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *The Journal of biological chemistry* 272, 6972-6978.

Maderna, P., Cottell, D.C., Berlasconi, G., Petasis, N.A., Brady, H.R., and Godson, C. (2002). Lipoxins induce actin reorganization in monocytes and macrophages but not in neutrophils: differential involvement of rho GTPases. *The American journal of pathology* 160, 2275-2283.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews* 8, 741-752.

Marques, C.A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W.E., and Eckert, A. (2003). Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *The Journal of biological chemistry* 278, 28294-28302.

Masters, S.C., Yang, H., Datta, S.R., Greenberg, M.E., and Fu, H. (2001). 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Molecular pharmacology* 60, 1325-1331.

Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., DeJardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular cell* 21, 749-760.

McMahon, B., Mitchell, S., Brady, H.R., and Godson, C. (2001). Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci* 22, 391-395.

McMahon, B., Stenson, C., McPhillips, F., Fanning, A., Brady, H.R., and Godson, C. (2000). Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *The Journal of biological chemistry* 275, 27566-27575.

Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.

Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free radical biology & medicine* 23, 783-792.

Menezes-de-Lima, O., Jr., Kassuya, C.A., Nascimento, A.F., Henriques, M.G., and Calixto, J.B. (2006). Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins & other lipid mediators* 80, 123-135.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.

Mitchell, S., Thomas, G., Harvey, K., Cottell, D., Reville, K., Berlasconi, G., Petasis, N.A., Erwig, L., Rees, A.J., Savill, J., *et al.* (2002). Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *J Am Soc Nephrol* 13, 2497-2507.

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* 273, 2926-2930.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research* 256, 12-18.

Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140, 619-630.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.

Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell* 140, 871-882.

Nishida, E., and Gotoh, Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends in biochemical sciences* 18, 128-131.

Norberg, E., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2010). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and biophysical research communications* 396, 95-100.

Ohse, T., Ota, T., Kieran, N., Godson, C., Yamada, K., Tanaka, T., Fujita, T., and Nangaku, M. (2004). Modulation of interferon-induced genes by lipoxin analogue in anti-glomerular basement membrane nephritis. *J Am Soc Nephrol* 15, 919-927.

Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z., Ishihara, N., and Mihara, K. (2005). Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *The EMBO journal* 24, 1375-1386.

Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature reviews* 9, 532-542.

Papayianni, A., Serhan, C.N., Phillips, M.L., Rennke, H.G., and Brady, H.R. (1995). Transcellular biosynthesis of lipoxin A4 during adhesion of platelets and neutrophils in experimental immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int* 47, 1295-1302.

Perretti, M., Chiang, N., La, M., Fierro, I.M., Marullo, S., Getting, S.J., Solito, E., and Serhan, C.N. (2002). Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med* 8, 1296-1302.

Platini, F., Perez-Tomas, R., Ambrosio, S., and Tessitore, L. (2010). Understanding autophagy in cell death control. *Current pharmaceutical design* 16, 101-113.

Pradelli, L.A., Beneteau, M., and Ricci, J.E. (2010). Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 67, 1589-1597.

Qiu, F.H., Devchand, P.R., Wada, K., and Serhan, C.N. (2001). Aspirin-triggered lipoxin A4 and lipoxin A4 up-regulate transcriptional corepressor NAB1 in human neutrophils. *Faseb J* 15, 2736-2738.

Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science (New York, N.Y)* 262, 695-700.

Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D. (1994). Programmed cell death and the control of cell survival. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 345, 265-268.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.

Reville, K., Crean, J.K., Vivers, S., Dransfield, I., and Godson, C. (2006). Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* 176, 1878-1888.

Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.

Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews* 8, 405-413.

Rodgers, K., McMahon, B., Mitchell, D., Sadlier, D., and Godson, C. (2005). Lipoxin A4 modifies platelet-derived growth factor-induced pro-fibrotic gene expression in human renal mesangial cells. *The American journal of pathology* 167, 683-694.

Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & development* 13, 3179-3184.

Romano, M. (2005). Lipoxin analogs and lipoxin formation in vivo. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 73, 239-243.

Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., and Serhan, C.N. (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* (New York, N.Y. 237, 1171-1176.

Sanak, M., Levy, B.D., Clish, C.B., Chiang, N., Gronert, K., Mastalerz, L., Serhan, C.N., and Szczeklik, A. (2000). Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. *Eur Respir J* 16, 44-49.

Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research* 45, 528-537.

Sawmynaden, P., and Perretti, M. (2006). Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 1351-1355.

Schaldach, C.M., Riby, J., and Bjeldanes, L.F. (1999). Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38, 7594-7600.

Scheid, M.P., Schubert, K.M., and Duronio, V. (1999). Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 31108-31113.

Scheid, M.P., and Woodgett, J.R. (2000). Protein kinases: six degrees of separation? *Curr Biol* 10, R191-194.

Schottelius, A.J., Giesen, C., Asadullah, K., Fierro, I.M., Colgan, S.P., Bauman, J., Guilford, W., Perez, H.D., and Parkinson, J.F. (2002). An aspirin-triggered lipoxin A4 stable analog displays a unique topical anti-inflammatory profile. *J Immunol* 169, 7063-7070.

Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C.N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874.

Schwab, J.M., and Serhan, C.N. (2006). Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 6, 414-420.

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., *et al.* (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-107.

Seger, R., and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-735.

Serhan, C.N. (1997). Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins* 53, 107-137.

Serhan, C.N. (2005). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 141-162.

Serhan, C.N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25, 101-137.

Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., and Wallace, J.L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *Faseb J* 21, 325-332.

Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008a). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8, 349-361.

Serhan, C.N., Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1984a). Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 5335-5339.

Serhan, C.N., Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1984b). Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 118, 943-949.

Serhan, C.N., Maddox, J.F., Petasis, N.A., Akritopoulou-Zanze, I., Papayianni, A., Brady, H.R., Colgan, S.P., and Madara, J.L. (1995). Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* 34, 14609-14615.

Serhan, C.N., and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* 6, 1191-1197.

Serhan, C.N., and Sheppard, K.A. (1990). Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *The Journal of clinical investigation* 85, 772-780.

Serhan, C.N., Yacoubian, S., and Yang, R. (2008b). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 3, 279-312.

She, Q.B., Ma, W.Y., Zhong, S., and Dong, Z. (2002). Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 is involved in serine 112 phosphorylation of Bad by ultraviolet B radiation. *The Journal of biological chemistry* 277, 24039-24048.

Shi, Y. (2006). Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Current opinion in cell biology* 18, 677-684.

Silva, R.M., Kuan, C.Y., Rakic, P., and Burke, R.E. (2005). Mixed lineage kinase-c-jun N-terminal kinase signaling pathway: a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20, 653-664.

Simchowitz, L., Fiore, S., and Serhan, C.N. (1994). Carrier-mediated transport of lipoxin A4 in human neutrophils. *The American journal of physiology* 267, C1525-1534.

Simoes, R.L., Niconi-de-Almeida, Y., da-Fe, A.R., Barja-Fidalgo, C., and Fierro, I.M. (2010). A synthetic analog of 15-epi-lipoxin A4 inhibits human monocyte apoptosis: involvement of ERK-2 and PI3-kinase. *Prostaglandins & other lipid mediators* 91, 10-17.

Soares, M.P., and Bach, F.H. (2009). Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends in molecular medicine* 15, 50-58.

Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 427-439.

Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2008). IAPs: what's in a name? *Molecular cell* 30, 123-135.

Stenfeldt, A.L., Karlsson, J., Wenneras, C., Bylund, J., Fu, H., and Dahlgren, C. (2007). Cyclosporin H, Boc-MLF and Boc-FLFLF are antagonists that preferentially inhibit activity triggered through the formyl peptide receptor. *Inflammation* 30, 224-229.

Stiles, B.L. (2009a). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10: extending its PTENTacles. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 757-761.

Stiles, B.L. (2009b). PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Advanced drug delivery reviews* 61, 1276-1282.

Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Takano, T., Fiore, S., Maddox, J.F., Brady, H.R., Petasis, N.A., and Serhan, C.N. (1997). Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *The Journal of experimental medicine* 185, 1693-1704.

Tang, D.G., Chen, Y.Q., and Honn, K.V. (1996). Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5241-5246.

Tang, Z., Arjunan, P., Lee, C., Li, Y., Kumar, A., Hou, X., Wang, B., Wardega, P., Zhang, F., Dong, L., *et al.* (2010). Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3beta phosphorylation. *The Journal of experimental medicine* 207, 867-880.

Teng, X., and Hardwick, J.M. (2010). The apoptosome at high resolution. *Cell* 141, 402-404.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y)* 281, 1312-1316.

Tsang, M., and Dawid, I.B. (2004). Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 2004, pe17.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science (New York, N.Y)* 228, 1440-1443.

Van Herreweghe, F., Festjens, N., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2010). Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* 67, 1567-1579.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature reviews* 6, 287-297.

Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. (1998). Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145-3156.

Wan, J., Fu, A.K., Ip, F.C., Ng, H.K., Hugon, J., Page, G., Wang, J.H., Lai, K.O., Wu, Z., and Ip, N.Y. (2010). Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30, 6873-6881.

Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., and Marais, R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.

Wasserman, W.W., and Fahl, W.E. (1997). Functional antioxidant responsive elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5361-5366.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001).

Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* (New York, N.Y. 292, 727-730.

Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., and Kitsis, R.N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual review of physiology* 72, 19-44.

Whitehurst, A., Cobb, M.H., and White, M.A. (2004). Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways. *Molecular and cellular biology* 24, 10145-10150.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* (New York, N.Y. 315, 856-859.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* 139, 1281-1292.

Wu, S.H., Lu, C., Dong, L., Zhou, G.P., He, Z.G., and Chen, Z.Q. (2005). High dose of lipoxin A4 induces apoptosis in rat renal interstitial fibroblasts. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 127-137.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 68, 251-306.

Wymann, M.P., and Marone, R. (2005). Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Current opinion in cell biology* 17, 141-149.

Yamaguchi, H., and Wang, H.G. (2001). The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 20, 7779-7786.

Yanaka, A., Zhang, S., Tauchi, M., Suzuki, H., Shibahara, T., Matsui, H., Nakahara, A., Tanaka, N., and Yamamoto, M. (2005). Role of the nrf-2 gene in protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress. *Inflammopharmacology* 13, 83-90.

Ye, R.D., Boulay, F., Wang, J.M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C.N., and Murphy, P.M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological reviews* 61, 119-161.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* (Chur, Switzerland) 24, 21-44.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews* 9, 47-59.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.

Zhang, X.D., Gillespie, S.K., and Hersey, P. (2004). Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* 3, 187-197.

Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O.T., and Døskeland, S.O. (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391, 449-450.

Zipper, L.M., and Mulcahy, R.T. (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 277, 36544-36552.

Zipper, L.M., and Mulcahy, R.T. (2003). Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci* 73, 124-134.

Zivny, J., Kleiner, P., Jr., Pytlík, R., and Andera, L. (2010). The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. *Current pharmaceutical design* 16, 11-33.

